

VŠB – Technická Univerzita Ostrava
Fakulta elektrotechniky a informatiky
Katedra měřicí a řídicí techniky

Elektronová mikroskopie v lékařství
Immuno - electron microscopy in medicine

Ostrava, 2009

Alžběta Blažková

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně. Uvedla jsem všechny literární prameny a publikace, ze kterých jsem čerpala.

Alžběta Blažková

Datum odevzdání bakalářské práce:

Poděkování

Chtěla bych touto cestou velmi poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce panu Mgr. Petru Tiefenbachovi za cenné rady, konzultace a připomínky spojené s vypracováním mého úkolu.

Zároveň bych ráda poděkovala paní MUDr. Janě Dvořáčkové, Ph.D. Dále bych ráda poděkovala panu Doc. MUDr. Jaroslavu Horáčkovi, CSc. a slečně Mgr. Haně Bielníkové za praktické rady.

Abstrakt

Cílem mé práce bylo seznámení s využitím elektronové mikroskopie v lékařství, především se zaměřením na obor patologie. Během přípravy jsem se obeznámila se základními principy pro přípravu vzorků pro elektronovou mikroskopii. Měla jsem možnost prohlížení vzorků pomocí mikroskopu TESLA BS 500 a také se seznámit s hlavními zásadami jeho údržby.

Klíčová slova

Elektronová mikroskopie, lékařství, patologie, TESLA BS 500, buněčné organely

Abstract

My graduation theses was targeted to identify with using the electron microscope in medicine focusing on pathology. During my preparation I made the acquaintance of fundamental principles of samples preparing for electron microscope. I was on a position to scan samples by using microscope TESLA BS 500 and I got acquainted with main principles of its servicing.

Key words

Electron microscopy, medicine, pathology, TESLA BS 500, cell organelles

Seznam použitých symbolů a zkratek

BE	Detektor odražených elektronů
CCD	Je elektronická součástka používaná pro snímání obrazové informace (Charge-Coupled Device)
DNA	Deoxyribonukleonová kyselina
ER	Endoplastické retikulum
GA	Glutaraldehyd
RNA	Ribonukleová kyselina
Rrna	Ribozomální ribonukleová kyselina
SE	Detektor sekundárních elektronů
SEM	Skenovací elektronový mikroskop
Slow scan kamera	Kamera s pomalým řádkovým rozkladem
TE	Detektor prošlých elektronů
TEM	Transmisní elektronový mikroskop
UV	Ultrafialové záření
ZnS	Sírník zinečnatý

Obsah

Úvod	1
1. Mikroskopie v lékařství	2
1.1 Elektronový mikroskop v medicíně	2
1.2 Srovnání optických a elektronových mikroskopů	3
1.2.1 Optický mikroskop	4
1.2.1.1 Fluorescenční mikroskop	7
1.2.1.2 Konfokální mikroskop	7
1.2.2 Elektronový mikroskop	7
1.2.2.1 Transmisní elektronový mikroskop (TEM) (Obr. 5)	7
1.2.2.2 Skenovací elektronový mikroskop (SEM) (Obr. 6)	8
1.3 Využití elektronových mikroskopů	9
1.4 Elektronová mikroskopie ve virologii	9
2. Historie elektronové mikroskopie	10
2.1 Využití mikroskopů v biologii	12
2.2 Transmisní elektronová mikroskopie v patologii	12
3. Technický popis Transmisního elektronového mikroskopu	14
3.1 Zdroj elektronů a elektromagnetické čočky	14
3.2 Osvětlovací soustava	17
3.3 Zobrazovací soustava	17
3.4 Vakuový systém	18
3.5 Záznam obrazu	19
3.6 Interakce elektronového svazku s preparátem a tvorba obrazu	20
3.6.1 Pružný(elastický) rozptyl	20
3.6.2 Nepružný rozptyl	21
3.7 Vady elektromagnetických čoček	21
3.7.1 Sférická vada	21
3.7.2 Chromatická vada	22
3.7.3 Osový astigmatismus	22
4. Buňka(cellula)	23
4.1 Typy buněk	24
4.2 Historický vývoj buněčné teorie	24
4.3 Buněčné organely	24
4.3.1 Buněčné jádro(nucleus)	25
4.3.1.1 Jadérko(nucleolus)	25
4.3.2 Mitochondrie	25
4.3.3 Ribosomy	25
4.3.4 Endoplasmatické retikulum	26
4.3.5 Golgiho komplex	26
4.3.6 Lysozomy	26
4.3.7 Peroxizomy	26
4.3.8 Centrioly	26
4.3.9 Cytoplasmatické inkluze	26
4.3.10 Cytoplazma	26
4.3.10.1 Cytosol	26
4.3.10.2 Cytoskelet	27

4.3.10.2.1.	Mikrotubuly	27
4.3.10.2.2.	Mikrofilamenta	27
4.3.10.2.3.	Intermediální filamenta	27
4.3.10.2.4.	Mikrotrabekuly	27
4.4	Příprava vzorků pro elektronovou mikroskopii	27
4.5	Pracovní postup pro zapnutí, seřízení a vypnutí elektronového mikroskopu	
TESLA BS 500	34
4.5.1	Zapnutí elektronového mikroskopu:	34
4.5.2	Základní centrování mikroskopu	34
4.5.3	Běžné centrování mikroskopu	36
4.5.4	Vypnutí elektronového mikroskopu:	36
4.5.5	Odstavení přístroje	36
4.6	Provoz a obsluha elektronového mikroskopu	36
5.	Vyhodnocení dosažených výsledků mikroskopických vyšetření	37
5.1	Vytvoření vzorků z plicní tkáně a kosterní svaloviny	37
5.2	Práce s mikroskopem	37
5.3	Záznam obrazu	37
6.	Závěr	43
	Seznam použité literatury	44
	Seznam příloh	A

Úvod

Moje práce je zaměřena na využití elektronového mikroskopu v lékařství. Hlavními obory, ve kterých je elektronový mikroskop využíván, jsou především virologie a patologie. Elektronová mikroskopie je metodou umožňující přímé studium ultrastruktury biologických objektů. Toto náleží do oblasti morfologických věd, jejichž hlavním cílem je prostudování vnějších tvarů i vnitřních struktur organismu. Buněčná ultrastruktura je tvořena prvky jako jsou lipoproteinové membrány, orgány, makrotubuly a mikrotubuly, makromolekuly, enzymatické komplexy a další. Ve světelném (nebo také optickém) mikroskopu tyto struktury nelze pozorovat detailně, zatímco elektronový mikroskop nám podrobný pohled na buněčné komponenty umožňuje.

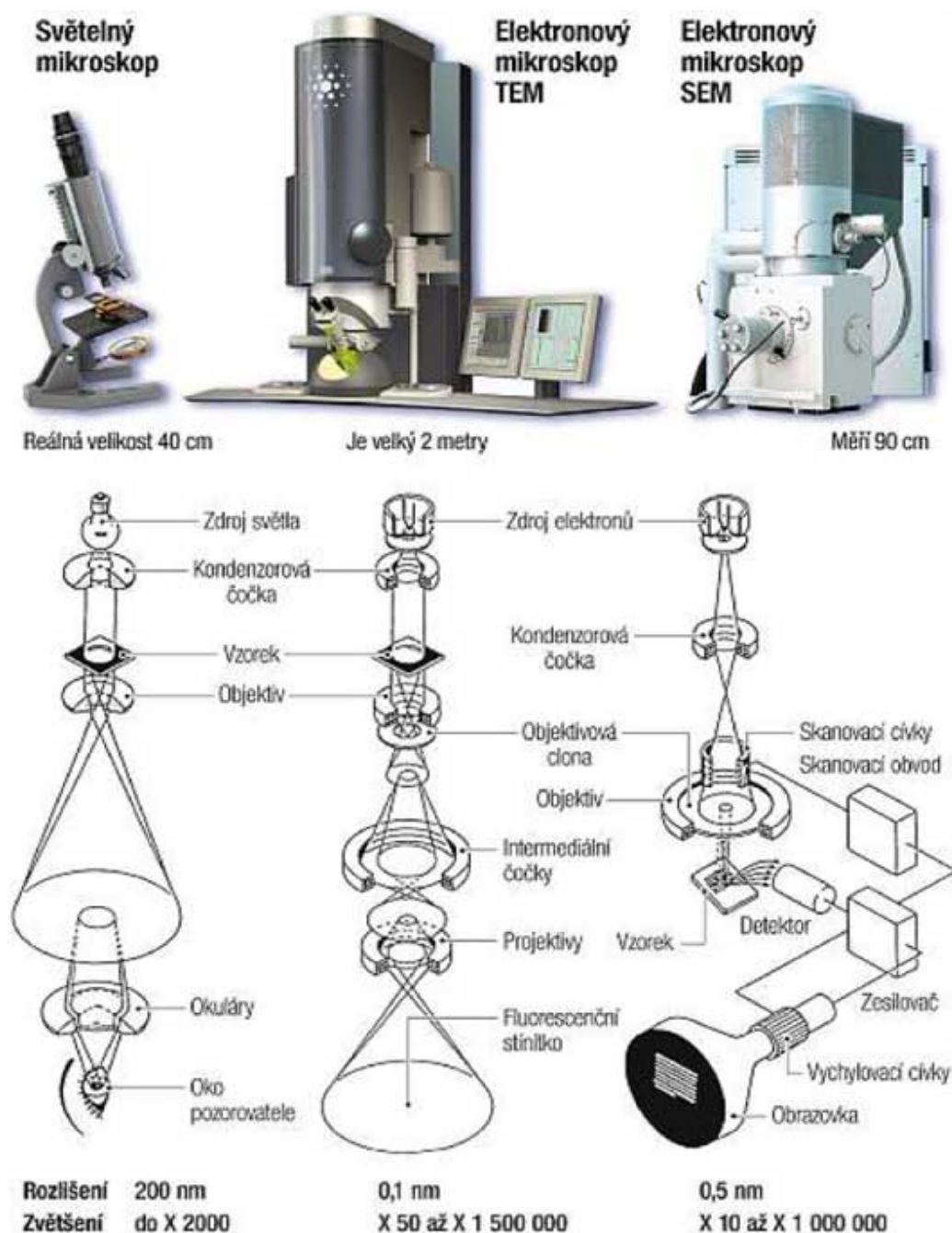
1. Mikroskopie v lékařství

Nezbytnou vyšetřovací metodou v lékařství je mikroskopie. Je metodou rychlou a jednoduchou. Pro světelnou mikroskopii není složité připravování vzorků, zatímco u mikroskopie elektronové je to obtížnější a příprava preparátů obvykle zabere několik hodin. V dnešní době jsou mikroskopy připojeny na počítače nebo digitální fotoaparáty, což nám umožňuje uchovávat velké množství dat po dobu nezbytně nutnou. Díky tomu je možné uchovávat si v databázi zajímavé patologické nebo netypické snímky a porovnávat je u zkoumaných nových preparátů. Je taktéž možné rychle rozpoznat, co se na daném snímku nachází. Tím pádem je možné rychlé zahájení léčby nebo rozhodnutí o dalším postupu. Archivace v dnešní době ve srovnání s moderní technikou je nenáročná, levná a také nevyžaduje žádné velké prostory na uschování. Mikroskopy nesmí chybět v laboratořích mikrobiologických, histologických, hematologických, imunologických, biochemických, na operačních sálech ani na patologii. Infekční činitelé se hledají různými mikroskopickými metodami, také se studují a hodnotí buněčné tkáně, složení tělních tekutin a krevní elementy. Pomocí mikroskopu můžeme najít příčiny různých nemocí, což potřebujeme k zahájení úspěšné léčby. Optické mikroskopy se používají v běžném provozu, ale jsou i oblasti, ve kterých optický mikroskop nestačí. Laboratoře jsou mimo optické mikroskopy vybaveny taktéž mikroskopy elektronovými. Elektronové mikroskopy umí zvětšovat až stotisíckrát. Díky jejich zvětšení lze vidět stavbu vnějších a vnitřních částí do většího detailu a tím nám umožňují lepší poznání vlastností. Mikroskopické metody mají nenahraditelné místo v lékařské diagnostice. V běžné praxi se setkáváme většinou s optickým mikroskopem a ve výzkumu je to většinou mikroskop elektronový.

1.1 Elektronový mikroskop v medicíně

Elektronové mikroskopy se používají na různých odborných klinických oborech, jako jsou například: virologie, mikrobiologie, parazitologie, dermatologie, nádorová diagnostika, genetické nemoci, metabolické nemoci, onemocnění ledvin, centrální nervový systém, kosterní svalstvo a periferní nervy.

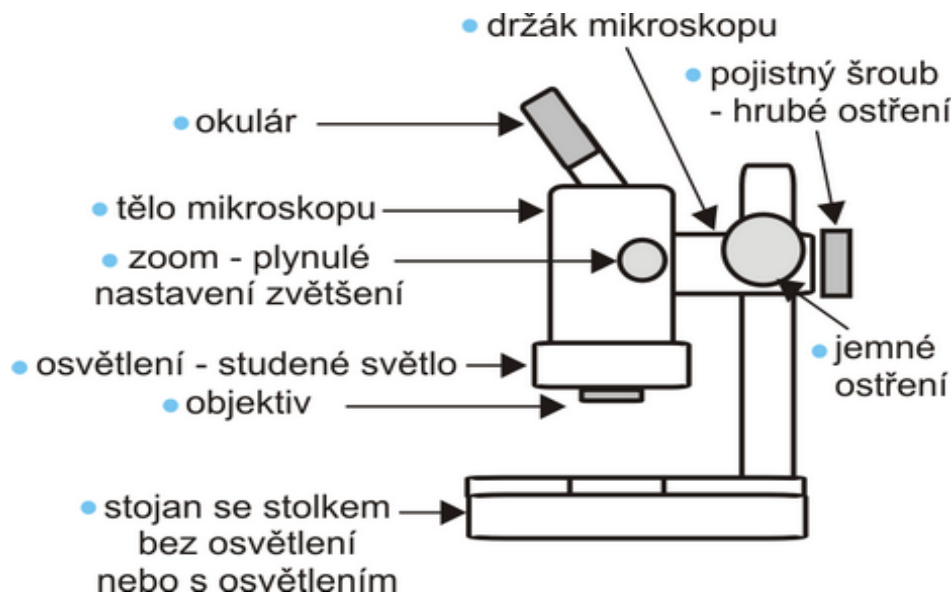
1.2 Srovnání optických a elektronových mikroskopů



Obr. 1 Porovnání světelného mikroskopu, elektronového mikroskopu TEM a elektronového mikroskopu SEM

1.2.1 Optický mikroskop

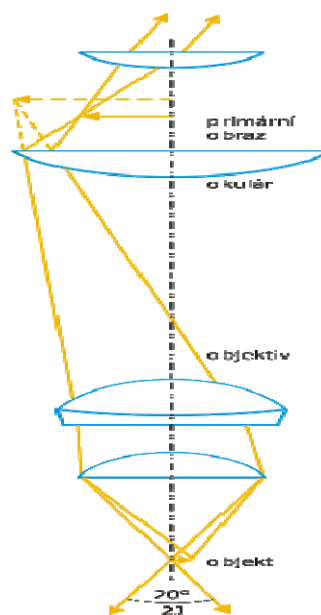
„Mikroskop, česky též drobnohled, je optický přístroj pro zobrazení malého sledovaného objektu ve zvětšení. Pod označením mikroskop je obvykle myšlen optický mikroskop, který pro zobrazení využívá světelných paprsků.”(citát Wikipedia). Díky optické mikroskopii můžeme pozorovat objekty a struktury do 2000 násobného zvětšení bez užití nějakých speciálních úprav mikroskopu. Konfokální mikroskop umožňuje pozorování nelesklých povrchů při větším zvětšení.



Obr. 2 Popis světelného mikroskopu

Mikroskopickým základem jsou čočky tvořící objektiv a okulár. Okuláry a objektivy můžeme měnit. Mikroskop se skládá ze dvou spojných soustav čoček se společnou optickou osou. Objektiv má malou ohniskovou vzdálenost. „Pozorovaný předmět se umísťuje blízko před předmětové ohnisko, takže vzniká skutečný, zvětšený a převrácený obraz.”(citát Wikipedia)

Obraz vzniká mezi okulárem a jeho předmětovým ohniskem. Obraz pozorujeme okulárem obdobně jako lupou, přičemž získáváme další zvětšení. Okulárová ohnisková vzdálenost se pohybuje v řádech centimetrů. Předmětové ohnisko okuláru a obrazové ohnisko objektivu nesplývají. Ohniska jsou od sebe vzdálena o hodnotu optického intervalu, která se pohybuje u mikroskopu kolem 15cm až 20cm (Obr. 3). Mikroskopická činnost je založena na vhodném uspořádání dvou systémů s konvexními čočkami. Jakmile máme takové upořádání, dochází ke zvětšení vzorku. Systém konvexních čoček se nazývá objektiv. Objektiv vytváří skutečný obraz se zvětšením 1 až 100. V okolí oka je systém čoček, který je nazýván okulárem. Okulár vytváří neskutečný obraz a má zvětšení 20x až 50x. Ve vzdálenosti asi 250 mm od oka se nachází obrazový prostor. Jednou z důležitých částí mikroskopů je zdroj světla s kondenzorem. Světlo může být pozorovaným objektem částečně absorbováno, někdy se spíše lomí, odráží nebo rozptyluje, při průchodu preparátem se mění fáze světelného vlnění, někdy i jeho polarizace. Pro srovnání optického mikroskopu s konfokálním optickým je důležité si nejprve ujasnit, co všechno mají společného: zobrazují celý objekt najednou, veškeré jeho body zároveň.



Obr. 3 Schéma optického mikroskopu

Podle osvětlení rozdělujeme mikroskopy na:

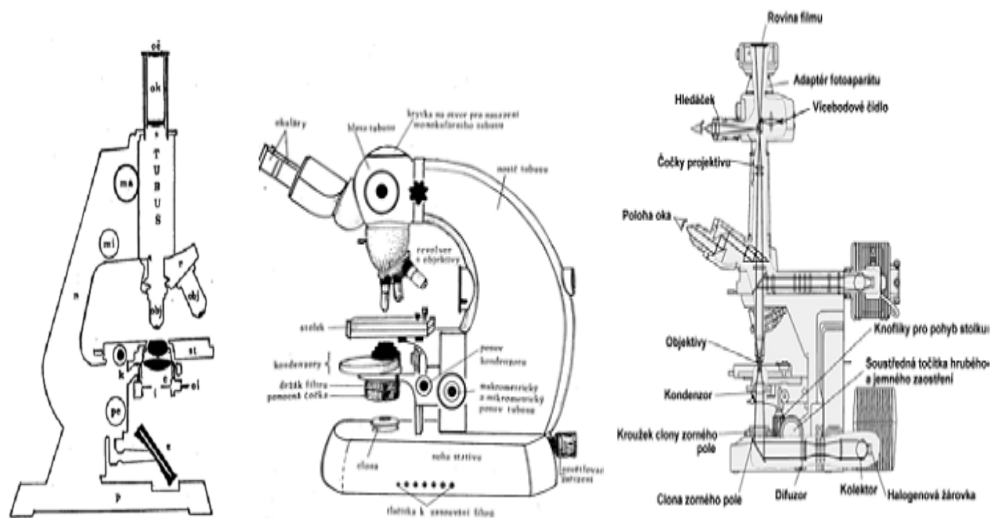
- pracující s procházejícím světlem
- pracující s dopadajícím světlem

Osvětlení v okolí objektivu může být:

- ve světelném poli
- v temném poli

Rozdělení podle počtu okulárů:

- monokulární
- binokulární
- triokulární



Obr. 4 Optické mikroskopy - monokulární, binokulární, triokulární

Základní díly optického mikroskopu

Optický mikroskop, ať se jedná o jednoduchý mikroskop, nebo složitý vědecký mikroskop, obsahuje tyto základní systémy:

Ovládání vzorku – přidržení a manipulace se vzorkem

Stolek – místo, kde spočívá vzorek

Svorky – slouží k přidržení vzorku na stolečku. (Protože si prohlížíte zvětšený obraz, i nejmenší pohyby vzorku mohou vést k tomu, že se části obrazu dostanou mimo vaše zorné pole.)

Osvětlení – osvětlení vzorku (Nejjednodušším osvětlovacím systémem je zrcadlo, které odráží pokojové světlo skrze vzorek.)

Objektiv – tvoří obraz

Čočky objektivu – shromažďují světlo od vzorku

Okulár – přenáší a zvětšuje obraz z čoček objektivu do vašeho oka

Karusel – otočný stojan, nesoucí mnoho objektivů

Tubus – udržuje okulár ve správné vzdálenosti od objektivu a blokuje rozptýlené světlo

Zaostření – poloha objektivu ve správné vzdálenosti od vzorku

- Knoflík hrubého zaostření – slouží k přemístění objektu do roviny zaostření objektivu
- Knoflík jemného zaostření – slouží k jemnému zaostření obrazu

Tubus je spojen s ramenem mikroskopu prostřednictvím ozubnice s pastorkem. Tento systém umožňuje zaostřit obraz při výměně objektivu nebo pozorovatelů, a odsunout objektivy ze stolku při výměně vzorků. Některé výše zmiňované části nejsou na schématu znázorněny a mezi jednotlivými mikroskopy se mění.

1.2.1.1 Fluorescenční mikroskop

V roce 1910 pozoroval Kohler při mikroskopování ultrafialovým světlem fluorescenci mnoha preparátů. Roku 1913 vznikl první fluorescenční mikroskop s UV excitací. Jako zdroj světla se používá vysokotlakých výbojek, které jsou naplněny xenonem nebo rtuť. Výbojky mají životnost až 500 pracovních hodin. Fluorescenční mikroskop je využíván na vizualizaci označených buněk, buněčných struktur nebo molekul a také k měření koncentrace iontů uvnitř buněk. Nejčastěji se měří změny koncentrace vápníku v cytoplazmě. Fluorescenční mikroskopie využívá zesilovačů obrazů nebo chlazených CCD kamer. Využití takových detektorů je nezbytné u většiny biologických vzorků, protože intenzita fluorescence nebývá postačující pro obyčejné kamery. Tento mikroskop se od běžného mikroskopu liší párem spektrálních filtrů. Jeden z nich je součástí osvětlovací soustavy a používá se k vymezení vlnové délky budicího záření. Další filtr je za objektivem, propouští jen emisi, budicí záření musí zadržet.

1.2.1.2 Konfokální mikroskop

Roku 1978 byl vyroben první laserový konfokální rastrovací mikroskop. Díky tomuto mikroskopu se můžeme zbavit neostroty v důsledku překrývání se zaostřeného obrazu s rozmazanými obrazy struktur. Tento jev je nejvíce rušivý u fluorescenční mikroskopie. U konfokální mikroskopie je pozorovaný objekt osvětlen bodovým zdrojem. Nejčastěji užívaným bodovým zdrojem je laserový paprsek fokusovaný na clonu. V obrazu se nachází bodová konfokální clonka. Obraz získáváme rastrováním bod po bodu. Existují tři různé typy rastrování (cestou rozmítání laserového paprsku, příčným posouváním vzorku před objektivem nebo posouváním objektivu před vzorkem). Konfokální obrazy jsou vždy zaostřené a představují optické řezy vzorkem. Skutečné mikroskopické objekty jsou trojrozměrné, tzn. mají určitou tloušťku.

1.2.2 Elektronový mikroskop

Je obdobou optického mikroskopu. Fotony jsou nahrazeny elektrony a optické čočky jsou vyměněny za čočky elektromagnetické. Vlnové délky jsou řádově menší než u fotonů. Elektronový mikroskop má vyšší rozlišovací schopnost. Dosahuje zvětšení až 1 000 000 x.

Typy

1.2.2.1 Transmisní elektronový mikroskop (TEM) (Obr. 5)

„Nepohyblivý elektronový svazek, detekce elektronů prošlých vzorkem (TE) na fluorescenčním stínítku nebo detektorem.“ (citát Wikipedia) Preparáty jsou ultratenké řezy 30-60 nm. Viditelný obraz se nám vytváří na fluorescenčním stínítku pomocí svazku elektronů, které prošly pozorovaným preparátem nebo které v preparátu difraktovaly. Kovová katoda je zdrojem proudu elektronů. Jakmile se katoda rozžhaví, vysílá urychlené elektrony el. proudem, které dosahují napětí 50 - 200 kV. Elektronovou čočkou prochází proud elektronů. Elektronová čočka je vytvořena z mag. pole cívky nebo pomocí el. pole zvláštního kondenzátoru. Soustředění elektronu na pozorovaný preparát nám umožňuje elektronová čočka. Preparát musí být velmi tenký, aby nám nepohlcoval elektrony. První elektronový obraz vytváří proud elektronů procházející elektronovou čočkou - objektivem. Část pozorovaného obrazu se elektronovou čočkou- projektivem- zvětší znovu a výsledný obraz se promítne buď na fotografickou desku či film nebo na stínítko pokryté vrstvou luminoforu. Tyto a mnohé další části elektronového mikroskopu jsou uloženy v nádobě, která je vzduchotěsná, nachází se v tubusu. Podrobnější popis transmisního elektronového mikroskopu nalezneme v kapitole č.3.



Obr. 5 TEM

1.2.2.2 Skenovací elektronový mikroskop (SEM) (Obr. 6)

„Pohyblivý svazek, zobrazení povrchu vzorku pomocí sekundárních elektronů (SE), odražených elektronů (BE), případně signálu z jiných detektorů.”(citát Wikipedia). Rozlišovací schopnosti zlata a uhlíku jsou voleny pro maximální dosažení kontrastu obrazu. Urychlovací napětí na (Obr. 7) je 15kV a zvětšení 300 000 x. Dosažené rozlišení je kolem 1,2 nm. Moderní přístroje mají rozlišovací schopnosti pod 0,5 nm. Skenovací elektronový mikroskop pracuje na základě dopadu úzkého svazku elektronů. Tento svazek dopadá postupně na všechna místa vzorku. Paprsek, který je odražený se převádí na viditelný obraz. Mechanická clona má za úkol vybírat pouze část elektronů dopadajících na preparát. Projekční čočka způsobuje dopad zaostřeného svazku elektronů na preparát. Zaostřený svazek elektronů skenuje synchronně s TV po povrchu preparátu. Můžeme rozlišovat 4 skupiny elektronů opouštějících povrch vzorku:

Zpětně odražené elektrony nám poskytují informaci o topografii vakua, ale také o materiálovém složení. Rozlišovací schopnost je okolo 50 - 200 nm.

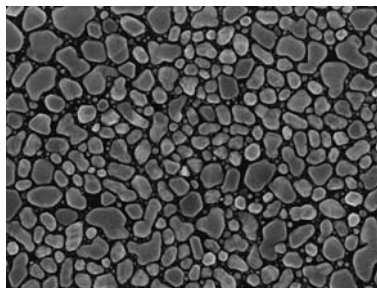
Sekundární elektrony mají za úkol poskytovat informaci topografickou. Jejich rozlišovací schopnost je 5 - 15 nm

Augerovy elektrony jsou vyraženy z materiálů a na základě zjištění jejich energie můžeme provádět kvalitativní analýzu

Primární elektrony se detekují stejně jako u transmisního elektronového mikroskopu(0,5nm)



Obr. 6 SEM



Obr. 7 Zlato na uhlík

	Optický mikroskop	Elektronový	
		Transmisní	Skenovací
pozorovací částice	fotony	elektrony	sekundární elektrony odražené elektrony
zobrazení pomocí	světelného pohyblivého paprsku	elektronového nepohyblivého svazku	elektronového pohyblivého svazku
čočky	optické	elektromagnetické	elektromagnetické
tloušťka preparátu	4-20 μm (1 μm = 1 x 10 ⁻³ mm)	100nm a tenčí (1nm = 1 x 10 ⁻⁶ mm).	v tloušťce 1,2nm (moderní přístroje pod 0,5nm)
zvětšení	zvětšení 200nm do x 2000	0,1nm x 50 až x 1 500 000	0,5nm x 10 až x 1 000 000

Tab. 1 - Porovnání vlastností mikroskopů

1.3 Využití elektronových mikroskopů

Zvětšení 5 000 – 100 000krát se používá v biologické praxi, cytologii a molekulární biologii.

1.4 Elektronová mikroskopie ve virologii

Nejdůležitější metodou zkoumání ve virologii je elektronová mikroskopie. Používá se buď imunoelektronové mikroskopie nebo transmisního elektronového mikroskopu. Preparáty se umísťují na měděnou nebo niklovou mřížku, která je potažená umělou hmotou. K zvýraznění struktur používáme kyselinu fosfowolframovou, molybdenan amonný, uranyl acetát. Pro určení velikosti používáme částice virů, tabákové mozaiky a latexové částice. [1], [2], [5], [9], [13], [21], [23], [24], [25], [26], [29], [30], [32], [33], [34], [38], [40], [41], [42], [43]

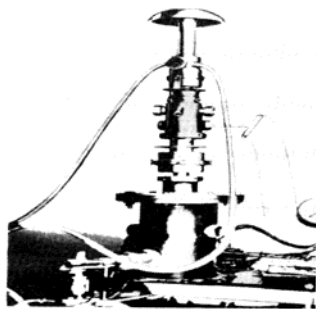
2. Historie elektronové mikroskopie

Elektronový mikroskop je uváděn jako jeden z významných vynálezů 20.století. K jeho sestrojení nestačila jedna myšlenka, ale postupné skládání objevů mnoha badatelů. Jeden ze základních objevů elektronu popsal J.J.Thompson v roce 1897.

K objevení elektronu došlo při studiu elektrických výbojů v Geisslerově trubici, která byla známá již v polovině 19.století. Dalším krokem bylo v roce 1925 publikování teorie Luise de Broglie o rychle letících částicích, které mají částicový i vlnový charakter jako třeba viditelné světlo.

Toto potvrdili v roce 1927 Davisson s Gernerem a Thompson s Reidem elektronovou difrakcí. V roce 1926 H. Buscha uveřejnil práci, která se zabývala analogií ve vychylování paprsku elektronů.

O transmisním elektronovém mikroskopu vznikla představa asi o dva roky později v Berlíně na Vysoké škole v kolektivu vedeném Knollem a Ruskou. K prvnímu zkonstruování mikroskopu došlo na počátku třicátých let. V roce 1932 byly publikovány první fotografie (Obr. 8) z elektronového mikroskopu a konstrukce elektromagnetické čočky od Knolla a Rusky.



Obr. 8 První mikroskop zkonstruovaný Knollem a Ruskou v roce 1930

V roce 1939 firma Siemens a Halske (Obr. 9) zahájila komerční výrobu transmisních elektronových mikroskopů, která zaručovala rozlišovací schopnost 10nm.

V roce 1986 obdržel Ruska Nobelovou cenu za konstrukci elektronového mikroskopu.

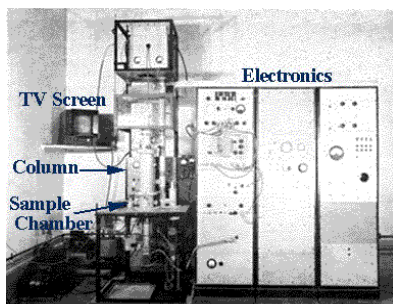


Obr. 9 První komerčně vyráběný transmisní elektronový mikroskop firmou Siemens a Halske od roku 1939

V roce 1938 M. von Ardenne popsal teoretický i praktický princip rastrování.

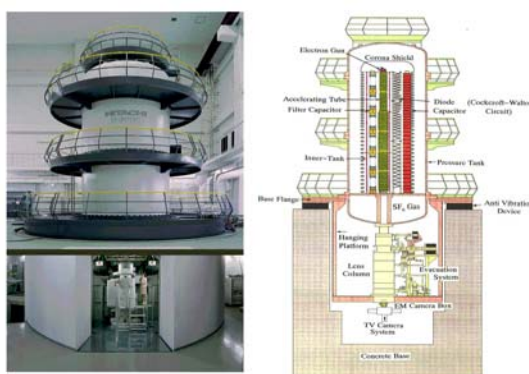
Skenovací elektronový mikroskop (SEM) poprvé sestrojil Zworikyn, který vynalezl fotonásobič a použil jej k detekci sekundárních elektronů.

V Anglii skupina vědců vedena C.W.Oatleyem se zabývala konstrukcí skenovacího elektronového mikroskopu. Jejich výsledky byly použity pro výrobu komerční verze firmou Cambridge Scientific Instruments roku 1965 (Obr. 10).



Obr.10 První komerčně vyrobený skenovací elektronový mikroskop v roce 1965 firmou Cambridge Scientific Instruments

3MV transmisní elektronový mikroskop (Obr. 11) je nejvýkonnějším nástrojem pohledu do mikrosvěta. Dva mikroskopy byly postaveny v Japonsku a v USA na konci 80.let 19.století. Lidé díky tomuto mikroskopu poprvé spatřili atom.



Obr.11 3MV elektronový mikroskop postavený v Osace v Japonsku

V 60.letech na území bývalého Československa v Ústavu přístrojové techniky v Brně vznikla skupina vedená V. Drahošem a A. Delongem zabývající se konstrukcí elektronových mikroskopů. Elektronový mikroskop Tesla BS (Obr. 12) byl výsledkem jejich práce.



Obr. 12 Stolní elektronový mikroskop Tesla BS 242

V této době Tesla Brno vyrábí mikroskopy pro holandskou firmu Philips a ve firmách Delong Instruments a Tescan (Obr. 13) se vyrábí skenovací elektronový mikroskop i příslušenství.



Vega Scanning Electron Microscopes

Obr. 13 Skenovací elektronový mikroskop Vega vyráběný firmou Tescan Brno

2.1 Využití mikroskopů v biologii

Od začátku vývoje transmisní elektronové mikroskopie (TEM) bylo zřejmé, že preparáty budou muset být velmi tenké vzhledem k penetrační schopnosti elektronového paprsku. Preparát musí být zbaven vody, aby jej bylo možno pozorovat.

Prvními mikroskopem pozorovanými objekty byly krevní buňky, různé druhy bakterií, rostlinný materiál a jiné. Preparáty byly zpracovány ve formě suspenze, nakápnuté na síťku s nosnou blankou. V mikroskopu nelze pozorovat vnitřní struktury, ale je možno pozorovat povrchové kontury. U nových typů mikroskopu bylo zřejmé, že bude třeba objevit vhodné metody přípravy preparátů. Nejprve k přípravě ultratenkých řezů sloužily vysokoobrátkové ultramikrotomy, které nožem z nehybného vzorku krájely tenké řezy. Nůž se otáčel velkou rychlostí (např. roku 1964 přístroj dosahoval 49 000 ot/min). Problémy ale nastávaly při sběru řezů, protože se rozptylovaly ve vzduchu.

Na konci 50.let se změnila konstrukce přístroje. Pohyblivé rameno ultramikrotomu mělo pevně uchycen preparát, naproti němu byl umístěn pevný nůž s vaničkou, která obsahovala vodu. Voda byla v úrovni řezné hrany. Nůž se přibližoval ke vzorku a po ukrojení ultratenkého řezu ten sklouzával z hrany nože na hladinu vody, ze které bylo možné s ním pracovat a natahovat jej na síťky. Dalším krokem vědců bylo přemýšlení nad vhodnými fixačními a zalévacími postupy, které by usnadnily zobrazování ultrastruktur biologických objektů. Díky transmisnímu elektronovému mikroskopu je možné vidět nejmenší živé organismy a viry.

2.2 Transmisní elektronová mikroskopie v patologii

Jak již bylo zmíněno výše, elektronová mikroskopie je hojně využívána v různých odvětvích medicíny. Největšího úspěchu získala tato zobrazovací metoda v oborech virologie a patologie. V patologii se jejího významného potenciálu využívá hlavně při diagnostice nádorů a různých zánětlivých onemocnění.

V případě zkoumání buněk, u kterých je podezření na přítomnost patologických změn se klinik většinou zaměřuje na pozorování několikati buněčných struktur.

Jednou z těchto struktur je buněčné jádro, které v rozpoznání patologických transformací

hraje velice významnou roli. Jednou z patologických změn jádra jsou extrémní invaginace jaderné membrány, které mohou vyústit až v jaderné pseudoinkluze. Další změny které lze

v elektronovém mikroskopu na jádře pozorovat, jsou změny v uspořádání chromatinu a jadérka.

Uspořádání chromatinu v chromozomech nám také ukáže, zda-li buňka prochází buněčným dělením nebo je v klidovém stádiu. Dalšími strukturami, které lze v elektronovém mikroskopu detailně pozorovat jsou ostatní buněčné organely, jako je např. Golgiho komplex, mitochondrie, endoplasmatické retikulum apod. Právě mitochondrie bývají další organelou, na které lze pozorovat výrazné strukturální změny, ať už je to v uspořádání vnitřní membrány nebo změny tvaru obecně. Alterace lze také pozorovat na sekrečních granulech a lysozomech, na buněčných inkluzích a samozřejmě také na povrchových membránách buněk a jejich strukturách jako jsou například mikrokylky trávicího ústrojí.

Stanovení správné diagnózy, pozorováním ultrastrukturálních změn v elektronovém mikroskopu, vyžaduje dostatečně proškoleného a zkušeného klinika.[2], [5], [9], [17], [18], [19], [20], [33], [35], [37], [39]

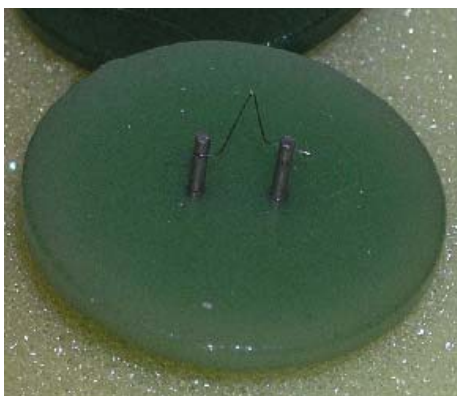
3. Technický popis Transmisního elektronového mikroskopu

Konstrukce elektronového mikroskopu je v principu stejná jako stavba mikroskopu světelného. Základním rozdílem však je, že k zobrazení preparátu používáme proud urychlených elektronů a k úpravě chodu elektronového svazku se používají elektromagnetické čočky, které jsou vlastně vhodně tvarovaným magnetickým polem. Kromě tubusu s elektronovou optikou jsou dalšími nezbytnými součástmi mikroskopu vakuový systém, přídavná elektronika (pro napájení čoček, zdroj vysokého napětí) a u novějších přístrojů software.

3.1 Zdroj elektronů a elektromagnetické čočky

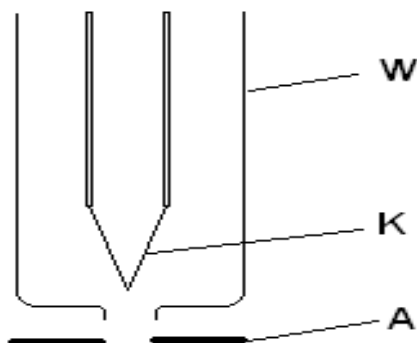
Elektronový mikroskop je složitým zařízením skládajícím se z několika částí. První důležitou částí je zdroj elektronů - elektronová tryska. Jedná se o elektron-optický prvek, ve kterém je dráha elektronů ovlivňována elektrickým polem. Elektrony jsou emitovány z katody, kterou prochází elektrický proud. Proud katodu zahřívá a následně dochází k termoemisi elektronů s jejího povrchu. Pro zvýšení emise elektronů se katoda tvaruje do tvaru písmene V, kde v místě ohybu dochází ke snadnějšímu úniku elektronů. Důležitým požadavkem je, aby nám elektronový zdroj poskytoval koherentní svazek elektronů.

Nejčastěji bývá katoda (Obr. 14) vyrobena z wolframu, který má nízkou výstupní energii valenčních elektronů a vysoký bod tání. Další výhodou je, že pro svůj provoz nevyžaduje vysokou hodnotu vakua. Teplota, na kterou bývá vlákno žhaveno, nepřímou úměrou ovlivňuje životnost katody. Katoda pracuje při provozní teplotě kolem 2600 °C, její životnost pak dosahuje asi 40-ti hodin.



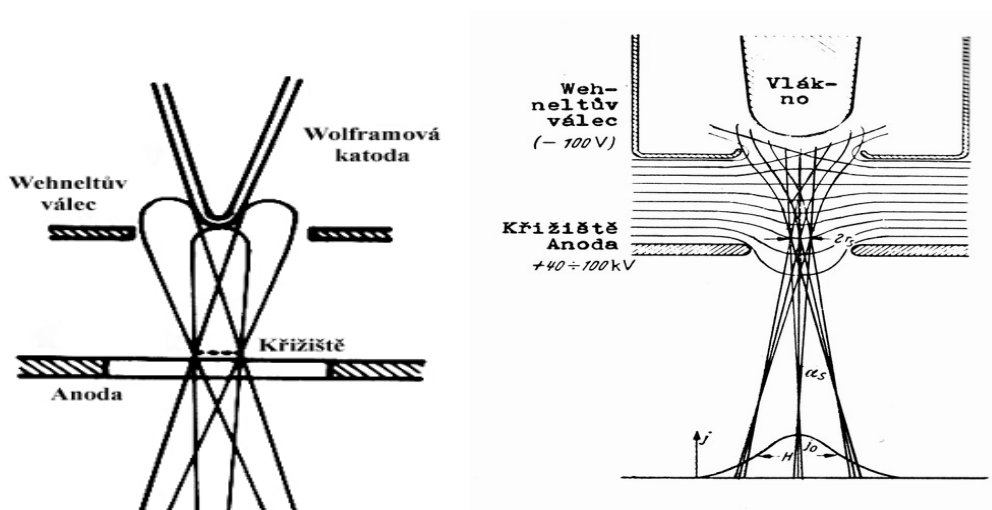
Obr. 14 Katoda

Wolframové vlákno katody, které je spojeno se záporným pólem urychlovacího napětí, je obklopeno tzv. Wehneltovým válcem, který má proti špičce vlákna otvor (Obr. 15). Za válcem je umístěna anoda s otvorem uprostřed, která je spojena s kladným pólem urychlovacího napětí a je uzemněna. Wehneltův válec má vzhledem ke katodě nastavitelné záporné předpětí, kterým v okolí katody vytváří elektrické pole. Toto pole zužuje svazek elektronů emitovaných z katody tak, že těsně před otvorem v anodě vytváří křižiště.



Obr. 15 Elektronová tryska. K - katoda, A - anoda, W - Wehneltův válec

Křížiště je vlastně bodovým zdrojem urychlených elektronů a Wehneltův válec zde slouží jako fokusační elektroda, kdy nám selektuje elektrony, které mají správný směr a energii (Obr. 16). Anoda nám potom vyselektované elektrony přitahuje a dává jim dostatečné zrychlení na průlet tubusem mikroskopu.



Obr. 16 Schématické znázornění vzniku křížiště

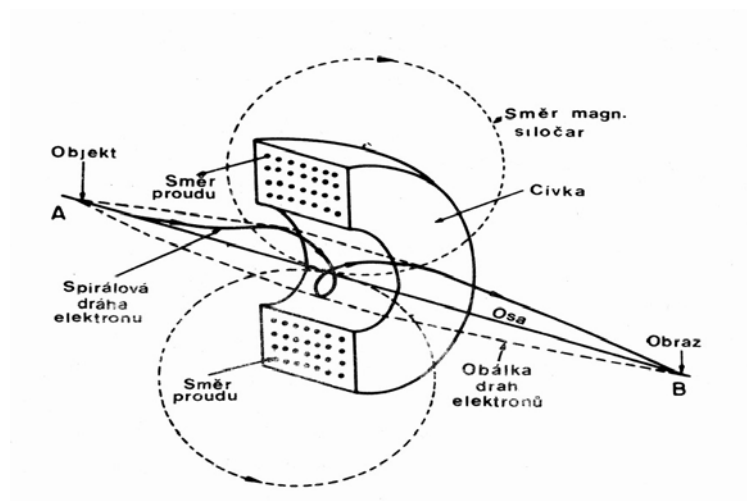
Šířka, dráha a rychlost svazku elektronů je dále upravena systémem clonek a čoček, které společně s elektronovou tryskou vytvářejí osvětlovací soustavu mikroskopu.

V novějších typech elektronových mikroskopů se používá místo wolframové katody výkonnější katoda s LaB6 (hexaborit lanthanu). Oproti wolframové katodě má lanthanová katoda 10x větší emisi elektronů avšak pro svůj provoz vyžaduje mnohem vyšší hodnotu vakua (minimálně 10^{-4} Pa). Tato katoda pracuje při teplotě kolem $1600\text{ }^{\circ}\text{C}$ a v provozu vydrží až 250 h. Dalším výkonným zdrojem elektronů je autoemisní tryska s neomezenou životností. Principem katody je, že elektrony jsou emitovány studeným wolframovým vláknem vyleptaným do hrotu. Proti hrotu je umístěna elektroda s kladným napětím 5kV, čímž kolem hrotu vzniká elektrické pole o určité intenzitě. Toto pole je schopno vytrhávat velké množství elektronů s povrchu wolframového hrotu. Výhodou katody je kromě její životnosti také její provozní teplota, která je rovna teplotě okolí. Limitujícím faktorem však je, že katoda pro svou práci vyžaduje vysoké hodnoty vakua, okolo 10^{-6} až 10^{-8} Pa.

Další důležitou a nenahraditelnou součástí elektronové optiky jsou elektromagnetické čočky. Tyto působí svým magnetickým polem na tvar trajektorie letícího elektronu (Obr. 17). Vlétné-li elektron do homogenního magnetického pole ve směru kolmém k magnetické indukci pole, pak magnetická síla působící na elektron zakřivuje trajektorii elektronu do tvaru šroubovice. Na náboj elektronu e , který se pohybuje v magnetickém poli o indukci B , působí síla F , jejíž velikost a směr lze určit ze vztahu :

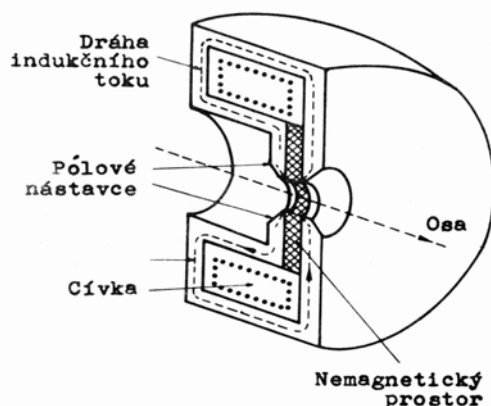
$$F = e \cdot v \cdot B \cdot \sin \alpha$$

kde v je rychlost elektronu, B je magnetická indukce a α je úhel, který mezi sebou svírají vektory v a B .



Obr. 17 Funkce elektromagnetické čočky

Nejjednodušší elektromagnetickou čočkou je solenoid, což je cívka s velkým počtem závitů, jejichž průměr je mnohem menší než délka cívky. Při průchodu elektrického proudu cívkou vzniká uvnitř solenoidu homogenní magnetické pole a v jeho okolí nehomogenní magnetické pole. Jinými slovy: uvnitř cívky jsou magnetické siločáry rovnoběžné s osou cívky a vně jsou zakřivené. Účinnost solenoidu se zvyšuje tím, že se cívka obklopí vrstvou měkkého železa. Měkké železo koncentruje siločáry tak, že magnetické indukční pole čočky je tím větší, čím větší proud čočkou prochází. Díky tomu se zvyšuje výkonnost elektromagnetické čočky, neboť dochází ke zkrácení její ohniskové vzdálenosti (Obr. 18).



Obr. 18 Schéma provedení elektromagnetické čočky

Oproti skleněným čočkám jsou elektromagnetické čočky nastavitelné. Změnou proudu procházejícího cívkou, lze měnit ohniskovou vzdálenost čočky. Při průchodu vysokého proudu čočkou vzniká teplo, které zvyšuje teplotu čočky, a proto je nutné elektromagnetické čočky chladit vodou.

3.2 Osvětlovací soustava

Osvětlovací soustava elektronového mikroskopu je tvořena elektronovou tryskou spolu s kondenzorovými čočkami.

Jak již bylo zmíněno výše, elektronová tryska nám slouží k emisi elektronů a v prostoru nazývaném křížiště se nám vytváří technický zdroj elektronů. Polohu křížiště lze měnit centrováním katody.

Urychlené elektrony produkované elektronovou tryskou poté vstupují do magnetického pole kondenzorových čoček. Kondenzor fokusuje elektronové paprsky z křížiště na preparát a zajišťuje jeho homogenní a intenzivní ozáření. Většinou se používají dvě kondenzorové čočky, kdy první z nich vytváří obraz křížiště a změnou její ohniskové vzdálenosti je možné měnit velikost obrazu. Druhý kondenzor tento obraz zaostřuje do roviny preparátu.

K odclonění mimoosových elektronových svazků slouží kondenzorové clony. Jedna clona s velkým průměrem je vestavěna v první čočce, další clona je výměnná, s velikostí otvorů v rozsahu 100 - 500 μm a je vestavěna v druhé čočce. V důsledku silného elektronového bombardování clon dochází často k jejich znečištění, a to vede ke zhoršení astigmatismu kondenzorové soustavy. Pro mikroskop je také důležitá úhlová apertura, při níž lze z roviny preparátu pozorovat křížiště. Největší je ve fokusu kondenzorové čočky a v závislosti na zaostření se mění. Je-li úhlová apertura malá, snižuje se chromatická vada čoček. Velká úhlová apertura je vhodná pro vyhledávání obrazu, avšak její maximální velikost je omezena kondenzorovými clonami.

3.3 Zobrazovací soustava

Základní součástí zobrazovací soustavy je objektiv a projekтив. Dalšími prvky soustavy jsou držák preparátu (Obr. 19), mezičočky a fluorescenční stínítko.

Do držáku se vkládají elektron-mikroskopické síťky, na kterých je umístěn vzorek. Držák zapadá do goniometrického stolku a umožňuje, pomocí mikrometrických šroubů, preparátem velmi jemně posouvat ve všech směrech a také ho i naklánět.



Obr. 19 Držák preparátu

V mikroskopu se zobrazovaný předmět nachází v těsné blízkosti pólových nástavců objektivu. Objektiv vytváří základní obraz předmětu a je nejvýkonnější čočkou mikroskopu. Obvykle je tvořen pouze jednou elektromagnetickou čočkou oproti projektivu, který mohou tvořit až čtyři elektromagnetické čočky. Objektiv je schopen největšího zvětšení a má nejkratší ohniskovou vzdálenost. Pro dosažení požadovaného výkonu, má cívka objektivu velký počet závitů, kterými protéká značný proud a objektiv se kvůli zamezení přehřátí musí chladit vodou. Charakteristikou objektivu je hloubka ostrosti v předmětové rovině, která udává vzdálenost o kterou se může preparát posunout od objektivu bez změny ostrosti. Objektivová clona se umísťuje těsně pod preparát, díky ní lze snížit vliv sférické vady objektivu a zvýšit kontrast výsledného obrazu.

Obraz vytvořený objektivem dále zvětšují na požadovanou velikost projektivy a mezičočky. Preparát lze pozorovat v obrazové rovině objektivu se zvětšením okolo 100x. Část tohoto obrazu se promítá do pomocného projektivu. Proud procházející čočkami projektivu lze regulovat a v závislosti na změně proudu se mění ohnisková vzdálenost a tím i zvětšení elektronového mikroskopu, např. v rozsahu 0,45x až 24,5 x. Hlavní projektiv je další čočkou, která se podílí na zvětšování obrazu a má obvykle konstantní zvětšení 100x. Maximální zvětšení celého zobrazovacího systému elektronového mikroskopu se rovná součinu zvětšení všech čoček, proto bývá často do soustavy zařazen ještě druhý pomocný projektiv, aby toto maximální zvětšení dosáhlo hodnoty 1 000 000x.

Urychlené elektrony nesoucí informaci o zobrazovaném předmětu nelze přímo vidět okem, proto je nutné tyto informace převést do oblasti viditelného světla. K pozorování obrazu se na dno tubusu umísťuje stínítko pokryté luminiforem, kterým je nejčastěji sirník zinečnatý (ZnS).

Luminifor je látka, která je schopna v závislosti na energii a množství dopadajících elektronů emitovat světlo různé intenzity o přibližně stejné vlnové délce. V případě ZnS vzniká světlo o vlnové délce 450 nm, ale v důsledku nečistot je emise posunuta k 550 nm, kdy na stínítku pozorujeme světlo zelené barvy. Mikroskop může být kromě velkého stínítka vybaven také malým stínítkem, na kterém lze detail obrazu ještě zvětšit pomocí světelného mikroskopu. Velikost zrn ZnS nám udává rozlišení stínítka a pohybuje se u velkého stínítka okolo 50 nm, u malého kolem 10 nm.

3.4 Vakuový systém

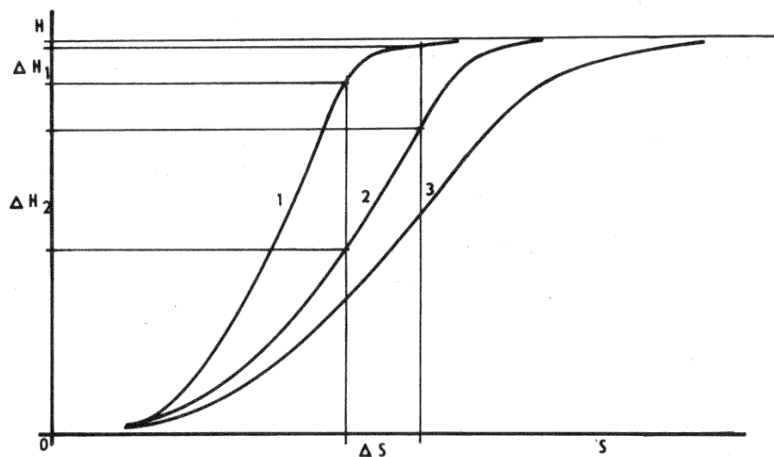
Aby nedocházelo ke srážkám urychlených primárních elektronů s molekulami vzduchu je nutno vnitřní prostor mikroskopu evakuovat. Pokud by k těmto srážkám docházelo, vedlo by to ke změnám energie a směru pohybu elektronů. Dalším důvodem je, že vzduch může způsobovat kontaminaci tubusu a pozorovaného preparátu.

Celý proces čerpání je řízen automaticky a kvalita vakua je kontrolována měrkami. Minimální hodnota pracovního vakua je 10⁻³ Pa. K čerpání vnitřního prostoru mikroskopu se používá několik typů vývěv. První vývěva je rotační, která zavzdušněný vnitřek mikroskopu předčerpá na hodnotu 10⁻¹ Pa a tím umožní práci difúzní vývěvě. Principem difúzní vývěvy je, že odpařováním a zpětnou kondenzací speciálního oleje s nízkou tenzí par snižuje tlak na hodnotu 10⁻³ až 10⁻⁴ Pa. Některé typy elektronových trysek, například autoemisní tryška, vyžadují pro svůj provoz vyšší hodnotu vakua. Dalšího zlepšení vakua docílíme pomocí vývěvy turbomolekulární a iontové. Tyto vývěvy jsou schopny vyčerpat prostor elektronového mikroskopu na hodnoty vakua 10⁻⁶ až 10⁻⁸ Pa. Nejdůležitějším prostorem mikroskopu, který potřebuje nejlepší hodnotu vakua, je oblast elektronové trysky.

3.5 Záznam obrazu

Konečným výstupem z transmisního elektronového mikroskopu je záznam obrazu pozorovaného předmětu. Snímek můžeme zaznamenat na speciální fotografický materiál nebo digitálně pomocí slow-scan CCD kamer.

Pro případ fotografického záznamu je pod stínítkem umístěna fotografická komora, v níž se nachází speciální zásobník s fotografickými filmy. Při vlastním pořízení fotografického záznamu se odkloní stínítko, pod nímž se nachází pouzdro s filmem na jehož povrch elektrony dopadnou. Negativní fotografický materiál, na který se záznam pořizuje, musí být citlivý na velmi krátké vlnové délky elektronového svazku a musí být stabilní při vysoké hodnotě vakua. Často používaným fotografickým materiálem je polyesterová podložka, na které je nanášena želatinová vrstvička s drobnými krystalky chloridu stříbrného. Po expozici zářením dojde k transformaci krystalků a k vytvoření latentního obrazu. Po vyvolání exponovaná místa zčernají, kdy míra zčernání závisí na intenzitě osvětlení. Fotografický materiál je charakterizován několika kritérii. První z těchto kritérií je citlivost, která udává závislost zčernání na intenzitě osvětlení. U fotografického materiálu pro transmisní elektronovou mikroskopii je snaha posunout citlivost do oblasti velmi krátkých vln. Sníženou citlivost materiálu k dopadu velmi krátkého vlnění elektronů kompenzuje zčásti jejich vysoká energie. Zvýšíme-li citlivost, zvýší se také zrnitost fotografického materiálu. Zrno je tvořeno shluky krystalů, které po vyvolání celé zčernají. Nejjemnější zrnitost umožňuje dosáhnout vysokého rozlišení a je výsadou kvalitního fotografického materiálu. Dalším z kritérií pro fotografický materiál je rozlišovací schopnost, která vyjadřuje počet bodů nebo čar, které je možno rozeznat po vyvolání daného fotografického materiálu v určité oblasti. Pro transmisní elektronovou mikroskopii se používají materiály s rozlišovací schopností od 100 čar/mm a výše. Třetím kritériem negativního materiálu je gradační křivka (Obr. 20).



Obr. 20 Gradační křivky: 1- kontrastního, 2- normálního, 3- měkkého fotografického materiálu, S množství světla, H optická hustota fotomateriálu po vyvolání

Tato křivka udává změnu zčernání v závislosti na změně intenzity osvitu. Pro záznam obrazu v transmisní elektronové mikroskopii se většinou volí materiál se strmější gradační křivkou.

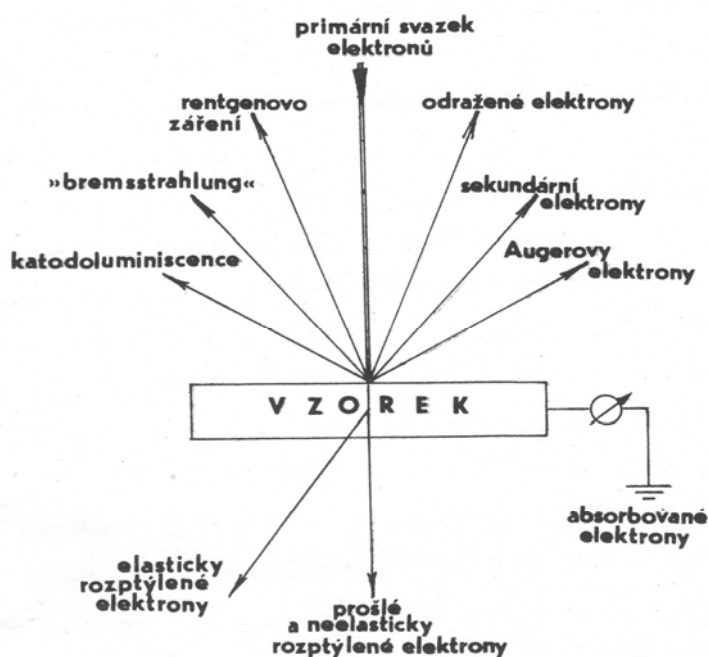
Strmější křivka je výhodná hlavně u biologických vzorků, které jsou většinou málo kontrastní, protože i menší změna osvitu výrazně změní stupeň zčernání fotografického materiálu. Strmost křivky můžeme rovněž ovlivnit volbou vývojky a dobou vyvolání. Důležitou

vlastností materiálu je také expoziční pružnost, kdy fotografický materiál musí být schopen reprodukovat celou škálu exponovaných odstínů i při výrazném, několikanásobném přexponování.

V současné době se dává více přednost digitálnímu záznamu na CCD kameru. Digitální záznam nám umožňuje sledovat získaný obraz v digitální podobě přímo na obrazovce monitoru počítače a také si jej uložit do paměti. Detektor kamery, který se vkládá do dráhy elektronového svazku, zaznamenává množství primárních elektronů a jejich energii v závislosti na místě dopadu. Obraz by měl být detektorem zaznamenán během několika vteřin a měl by být ihned k dispozici v počítači k dalšímu zpracování a analýze. Dalšími požadavky na detektor jsou: velký počet pixelů (aby při detekci elektronového obrazu nedocházelo k degradaci jeho rozlišení a přidání šumu), široký dynamický rozsah a výborná linearita.

3.6 Interakce elektronového svazku s preparátem a tvorba obrazu

Interakce mezi elektrony ze zdroje a hmotou zobrazovaného předmětu jsou vlastním zdrojem obrazu v elektronovém mikroskopu. Při dopadu urychlených elektronů na preparát nám vzniká několik druhů interakcí (Obr. 21).



Obr. 21 Chování primárního paprsku elektronů po dopadu na tenkou destičku preparátu

Pro transmisní elektronovou mikroskopii jsou však nejdůležitější dva základní procesy z těchto interakcí

3.6.1 Pružný(elastický) rozptyl

Urychlený elektron je při průletu elektronovým obalem atomu preparátu vychýlen pod úhlem, který je tím větší, čím blíže tento elektron míjí jádro a čím větší je náboj jádra (tj. atomové číslo). Tento úhel může přesáhnout i 90° a elektron je pak zpětně odražen. Při tomto

dějí se energie primárních elektronů nemění. Počet elektronů, které jsou vychýleny vně určitého prostorového úhlu, závisí na součinu hustoty a tloušťky preparátu v daném místě. Část elektronů vychýlených preparátem o příliš velký úhel je zachycena objektivovou clonou a tím vyřazena z tvorby obrazu preparátu na stínítku. Vyřazení části elektronů způsobí, že se mění intenzita elektronového paprsku, který dopadá na stínítko a tím vzniká kontrast obrazu, označovaný jako amplitudový kontrast. V důsledku rozdílu drah elektronů odchýlených pod různým úhlem nám vzniká také fázový kontrast, který se rovněž podílí na tvorbě obrazu a různých stupňů šedi.

3.6.2 Nepružný rozptyl

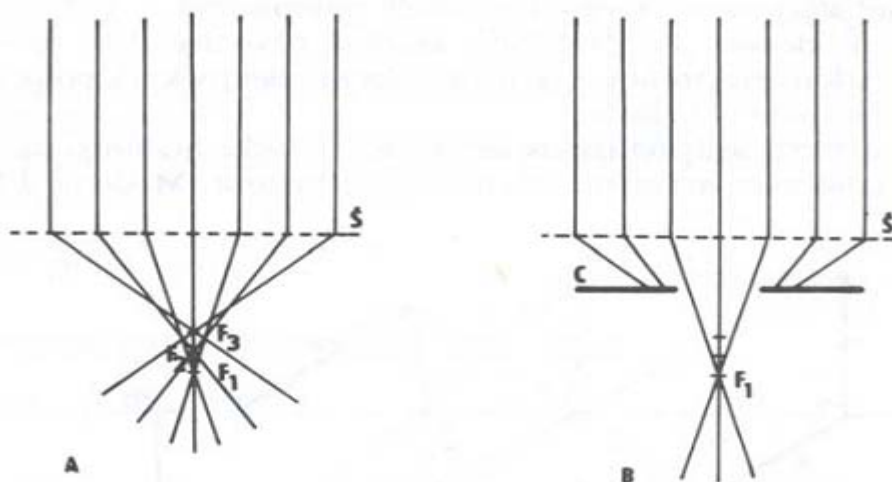
Dochází k němu při srážkách primárních urychlených elektronů s elektrony atomů preparátu. Při této interakci dochází ke srážce dvou částic stejné hmotnosti a primární elektrony při ní ztrácejí část své energie. K odchýlení elektronů od původního směru nedochází a tudíž se všechny elektrony podílejí na tvorbě obrazu na stínítku. Protože dochází ke změně energie a rychlosti těchto elektronů, mění se i jejich vlnové délky. V důsledku toho jsou tyto elektrony jedním ze zdrojů vad zobrazení. S tloušťkou preparátu a s klesajícím urychlovacím napětím jejich nepříznivý vliv roste.

3.7 Vady elektromagnetických čoček

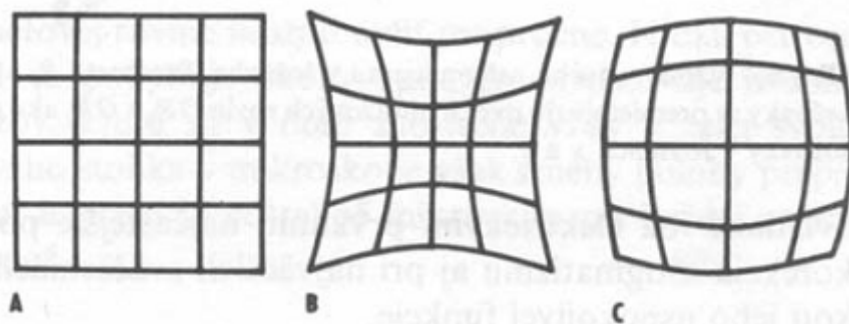
Elektromagnetické čočky mají obdobné vady jako skleněné čočky světelného mikroskopu. Důvodem je, že uvnitř reálné elektromagnetické čočky není magnetické pole zcela homogenní. Tyto vady negativně ovlivňují obraz vytvořený čočkou, hlavně jeho kontrast, rozlišovací schopnost a hloubku ostrosti.

3.7.1 Sférická vada

Čočka není schopna zaostřovat všechny paprsky vycházející z bodového zdroje opět do jednoho bodu. Elektrony procházející vnější částí čočky jsou zaostřeny do bodu, který je blíže k čočce, než elektrony procházející čočkou v těsné blízkosti optické osy. Důsledkem je, že zvětšení ve středu čočky je jiné než na okrajích. Rozsah sférické vady je závislý na ohniskové vzdálenosti čočky, a je tím větší, čím větší ohnisková vzdálenost je. Tato vada se omezuje zařazením clony, která odstraňuje okrajové paprsky (Obr. 22),(Obr. 23).



Obr. 22 Vznik sférické vady, kdy paprsek procházející okrajem čočky a jejím středem se lámou do různých ohnisek: B - omezení sférické vady vložení clony



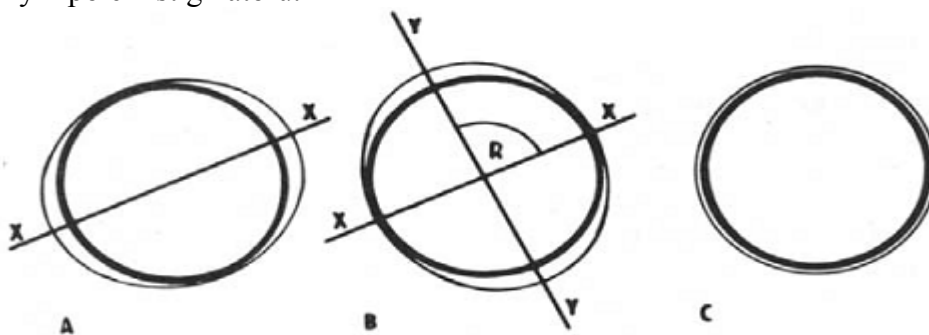
Obr. 23 Deformace obrazu působením sférické vady: A - nezkreslený obraz, B - poduškovité zkreslení, C - soudkovité zkreslení

3.7.2 Chromatická vada

Je způsobená rozdílnými vlnovými délkami elektronů v paprsku. Pomalejší elektrony s větší vlnovou délkou jsou v magnetickém poli cívky vychylovány jinak a protínají osu cívky v jiném bodě, než elektrony s vyšší rychlostí. Vliv chromatické vady lze snížit stabilizací urychlovacího napětí, které nám poskytne koherentnější elektronový svazek a použitím tenkých preparátů.

3.7.3 Osový astigmatismus

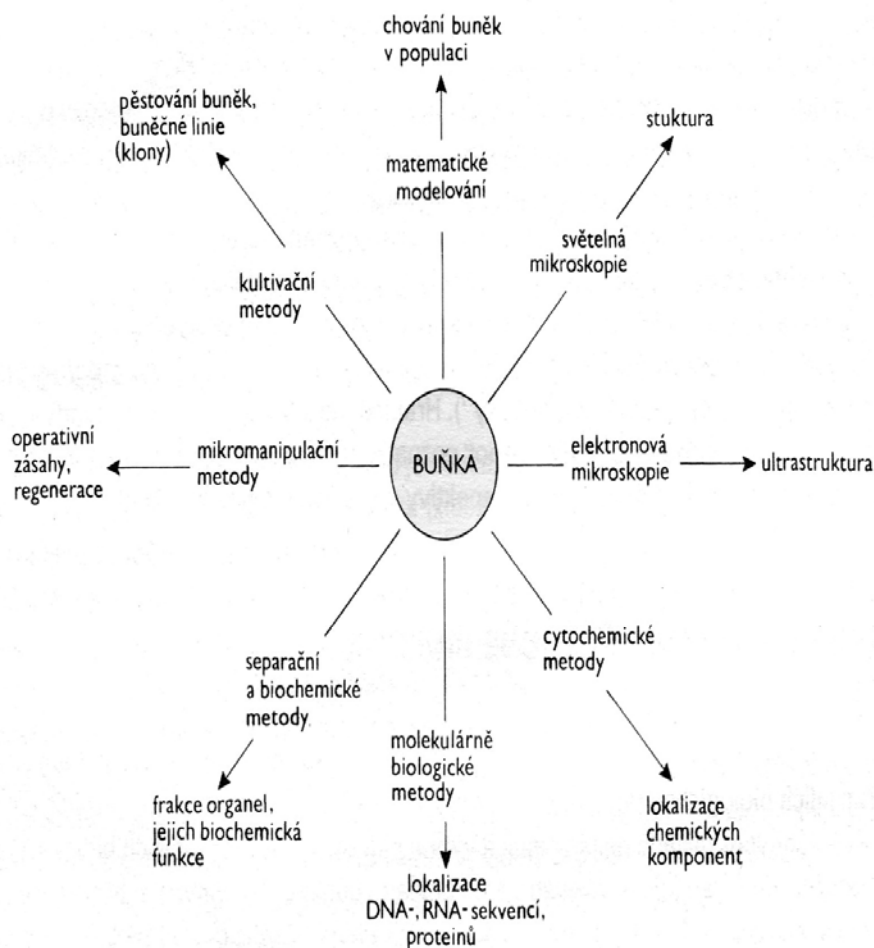
Vzniká v důsledku nesymetrie magnetického pole. Elektrony, které procházejí čočkou v různých rovinách pak mají různé ohnisko (obr. 24). Častým zdrojem astigmatismu jsou různé nečistoty na vnitřních plochách mikroskopu. Tato vada se koriguje magnetickým polem stigmátoru.



Obr. 24 astigmatismus čočky se projevuje protažením obrazu objektu do jednoho směru pod fokusem - A a do kolmého směru nad fokusem - B. Po korelaci stigmátorem se objekt rozostřuje rovnoměrně - C.

[1], [3], [9], [10], [11], [12], [13], [16], [21], [22], [33]

4. Buňka(cellula)



Obr. 25 Zobecňování výsledků specializovaných věd. Specializované vědní obory poskytují svými metodami informace o různých vlastnostech společného předmětu - buňky. Jsou poznávacími sondami do života buněk různých typů. Jejich výsledky zobecňuje obecná biologie buněk.

4.1 Typy buněk



Obr. 26 Typy buněk (jaterní,svalová,nervová,tuková,kostní,spermie,červené krvinky a kožní)

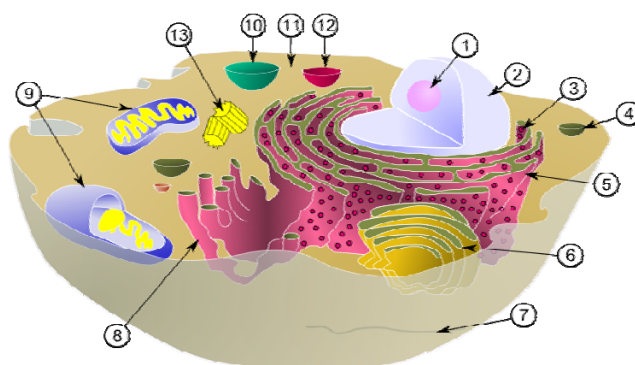
4.2 Historický vývoj buněčné teorie

Životní děje v lidském nebo jiném organismu probíhají pouze v buňkách a jsou realizovány interakcemi. Ve 40.letech min.století byly položeny základní buněčné teorie. Veškeré mnohobuněčné organismy, jak rostlinné tak živočišné, jsou vytvořeny z buněk. Toto zjištění je spojeno se jmény Jana Evangelisty Purkyně (roku 1837), který vyslovil první myšlenku o analogické struktuře živočišných a rostlinných těl, M.J.Schleiden a také Theodora Schwanna, který uvedl ve své knize „Mikroskopická studia o schodě ve struktuře a růstu živočichů a rostlin“ rozdíl mezi živočišnou a rostlinnou buňkou.

R.Virchow (1858) uvedl teorii, že nové buňky vznikají pouze rozdělením již existujících buněk. Na konci minulého a začátkem tohoto století obohatil buněčnou teorii poznáním, že veškeré buňky živočišné i rostlinné mají podobnou strukturu. Buňky obsahují organely se stejnými nebo analogickými funkcemi. Buňka je strukturní i funkční základní jednotka všech živých organismů. V 50.letech byla objevena univerzálnost genetického kódu. Podstatným procesem buňky je zdvojení genetické informace, která je zapsána do deoxyribonukleové kyseliny (DNA).

4.3 Buněčné organely

Organely jsou specializované části buňky (Obr. 27), které jsou uloženy v cytoplazmě a vykonávají zvláštní funkce nezbytné pro život buňky: syntézu bílkovin, získávání energie, trávení živin a jiné. Jsou analogií složitých orgánů.



Obr. 27 Schéma živočišné buňky. Organely: (1)jadérko, (2)jádro, (3)ribosom, (4)membránový váček, (5)drsne endoplasmatické retikulum (ER), (6)Golgiho komplex, (7)cytoskelet, (8)hladké ER, (9)mitochondrie, (10)vakuola, (11)cytoplasma, (12)lysozom, (13)centrioly

4.3.1 Buněčné jádro(nucleus)

Je podstatnou částí buňky, obsahuje chromozomy, jadérko, ribosomy a karyoplasmu. Jádro ohraničuje dvojvrstvá membrána s jadernými póry, které umožňují kontakt jádra s cytoplasmou. Podle druhu buňky se mění tvary jádra (kulovitý, ovoidní, ledvinovitý, vřetenovitý a segmentovaný). Nukleoplasmatický index vyjadřuje velikost jádra (poměr jeho objemu k poměru cytoplasmy). Jádro obsahuje chromozomy, které jsou nositeli dědičnosti v podobě deoxyribonukleové kyseliny. Lidské buněčné jádro obsahuje 46 chromozomů (23 párů). U ženského pohlaví jsou dva chromozomy X a u mužského pohlaví jeden X a druhý menší, tvarově odlišný Y chromozom. Většina buněk má jedno jádro, mohou být i buňky dvoj i vícejaderné. Výjimku však tvoří červené krvinky člověka, které během diferenciacce a zrání jádro ztrácejí.

4.3.1.1 Jadérko(nucleolus)

je obvykle kulovitého tvaru, prokazatelné již pomocí světelného mikroskopu. Obsahuje nukleoproteiny a rRNA a účastní se regulace buněčného dělení. Není ohraničeno jadernou membránou. Počet jadérek v jádře kolísá od jedné do čtyř.

4.3.2 Mitochondrie

Mají tvar drobných tyčinek o velikosti 0,5 - 5μm dlouhých. Jsou ohraničeny dvěma membránami, vnější a vnitřní. Vnitřní membrána je zprohýbána v krysty a vnitřní prostor se nazývá matrix. Je základním zdrojem energie buňky a hraje důležitou roli v oxidativní fosforylaci, která probíhá na vnitřní membráně mitochondrie. Mají svou vlastní genetickou informaci.

4.3.3 Ribosomy

Jsou to nejmenší kulovité organely v buňce složené s RNA a bílkovin. Jsou viditelné pouze elektronovým mikroskopem. Jejich funkcí je syntéza bílkovin. Mohou být vázány na endoplasmatické retikulum, nebo mohou být uloženy v cytoplasmě buňky. Rozměry ribosomu jsou 12-25nm v průměru, jednotlivě mohly být rozlišeny teprve pomocí elektronového mikroskopu. Vyskytují se buď izolovaně nebo ve skupinách tvaru rozet, spirál nebo závitů.

4.3.4 Endoplasmatické retikulum

Systém plochých váčků a kanálků navzájem propojených a ohraničených membránou. Najdeme jej v blízkosti jádra. Hlavní funkcí je proteosyntéza. Rozpoznáváme drsné endoplasmatické retikulum, které má na povrchu vázané ribosomy, jejím hlavním znakem je vysoká proteosyntéza. Hladké endoplasmatické retikulum je bez ribosomů, jeho hlavním úkolem je tvorba glykogenu a tuků.

4.3.5 Golgiho komplex

Je velmi podobný endoplasmatickému retikulu. Je tvořen systémem váčků a kanálků a slouží k „dozrávání“ buněčných produktů. V elektronovém mikroskopu je tvořen systémem membrán a vakuol ohraničených hladkou membránou. Funkcí Golgiho aparátu je sekreční činnost buněk.

4.3.6 Lysozomy

Jsou váčky o průměru 0,2 - 0,8 μm ohraničené membránou. Vznikají odštěpením z Golgiho komplexu. Tloušťka jednotkové membrány je 6 nm. Dělíme je na primární a sekundární. Obsahují proteolytické a hydrolytické enzymy, které degradují cizí elementy fagocytované buňkami imunitního systému.

4.3.7 Peroxizomy

Jsou malé váčky, ohraničené membránou. Obsahují enzymy peroxidázy a katalazy. Jejich průměr je 0,1 - 0,5 μm. Obsahují enzymy štěpící mastné kyseliny a aminokyseliny.

4.3.8 Centrioly

Jsou prokazatelné ve většině buněk jako dvojice zrn o rozměrech 0,5 x 0,15 μm, které je možné vidět pod světelným mikroskopem. U elektronové mikroskopie mají podobu dvojic válců o průměru 150 nm a délce 300 - 500 nm, které jsou k sobě navzájem kolmé. V buňce se nachází obvykle dvě centrioly. Vychází z nich mikrotubuly cytoskeletu a také dělicí vřeténka podílející se na buněčném dělení.

4.3.9 Cytoplasmatické inkluze

Jsou to většinou kapénkovité nebo krystalické struktury tvořené rezervními (glykogen, tuky,) nebo odpadními látkami. Tyto látky se v buňce ukládají dočasně nebo trvale.

4.3.10 Cytoplazma

Dělíme na hyaloplasmu, organidy buněčné, metaplasmu a paraplasmu. Obklopuje jádro. Je ohraničena cytoplazmatickou membránou (plazmalemou). Nachází se v ní buněčná organela.

Tvoří ji:

4.3.10.1 Cytosol

Tekutá hmota, obsahující velké množství vody, proteinu, lipidů, sacharidů a solí.

4.3.10.2 Cytoskelet

Představuje oporný aparát buňky, který zajišťuje stálost, proměnlivost tvaru buňky, její pohyblivost, fagocytózu a jiné.

Cytoskelet obsahuje:

4.3.10.2.1. *Mikrotubuly*

Trubicové útvary nacházející se v centriolech, dělicím vřeténku, a v nervových buňkách. O průměru 20 - 22 nm. Jsou v cytoplasmě rozptýleny nebo uspořádány do svazečků. Tloušťka stěny je 5nm.

4.3.10.2.2. *Mikrofilamenta*

Tenké vláknité útvary bílkovinné povahy. Vyskytují se buď v rozptýlené formě nebo uspořádané do svazečků. V průměru měří 5 - 15 nm. Dělíme je na tonofilamenta, myofilamenta a neurofilamenta.

Tonofilamenta jsou součástí buněk epidermis. Pomáhají udržovat tvar a mechanickou odolnost.

Myofilamenta jsou podstatnou součástí cytoplasmy, svalových buněk a vláken.

Neurofilamenta

4.3.10.2.3. *Intermediální filamenta*

Vlákná mající podpůrnou funkci.

4.3.10.2.4. *Mikrotrabekuly*

Nejtenčí vlákenka tvořící pravidelnou síť trámečků s úpony na buněčnou membránu.

4.4 Příprava vzorků pro elektronovou mikroskopii

Příprava vzorků pro elektronovou mikroskopii je v principu stejná jako příprava vzorků pro mikroskopii světelnou. Důležitým předpokladem, který musí být u vzorků pro elektronovou mikroskopii splněn, je úplné odvodnění preparátu. Preparát se v mikroskopu nachází v prostředí vysokého vakua. Pokud by vzorek obsahoval vodu, docházelo by k jejímu bouřlivému uvolňování. Důsledkem toho by docházelo k degradaci vzorku spolu se srážkami a brzděním urychlených elektronů s molekulami vody. Další z podmínek, která musí být při přípravě vzorků splněna, je tloušťka preparátu. Kvůli nízké penetrační schopnosti elektronů by neměla tloušťka preparátů překračovat 100nm. Preparátem silnější tloušťky urychlené elektrony neprojdou a pokud ano, tak často dochází ke zhoršení chromatické vady a preparát pak nelze zaostřit.

Existují dvě možnosti, jak vzorky pro transmisní elektronovou mikroskopii připravit. Při přímé metodě můžeme do mikroskopu vložit celý studovaný objekt zbavený vody. Mohou to být objekty velmi malých rozměrů jako jsou viry, bakterie nebo izolované buněčné organely a molekuly. Z větších vzorků musíme připravit řezy.

Druhou možností přípravy je nepřímá metoda, kdy v mikroskopu pozorujeme repliky studovaného objektu.

Vzorky zpracovávané pro transmisní elektronovou mikroskopii by neměly přesahovat velikost 1 mm. Pro patologii a histologii se vzorky tkání většinou připravují formou řezů. Preparáty připravené pro transmisní elektronovou mikroskopii prochází pěti obecnými kroky: fixací, odvodněním, zaléváním, krájením a kontrastováním.

Cílem fixace je zabránění degradačních procesů a stabilizace vzorků pro další kroky přípravy. Je snahou, aby při fixaci docházelo k minimálním změnám ultrastruktury buňky oproti nativnímu stavu.

Nejčastěji se k fixaci používají chemická činidla. Chemická fixace je založena na reakcích činidel se složkami biologického preparátu, kdy dojde ke stabilizaci a imobilizaci vnitřku buňky bez větších ultrastrukturálních změn. Fixace je ovlivněna řadou faktorů, které mají vliv na její kvalitu. V první řadě je důležitý výběr fixačního činidla, zvolená koncentrace a rychlost penetrace vzorkem. Na rychlost penetrace má vliv velikost vzorku, způsob a délka fixace. Fixaci dále ovlivňují také teplota, pH a osmolalita fixačního činidla. Musí se také přizpůsobit pH a osmolalita fixačního roztoku zkoumanému preparátu, aby nedošlo k poškození vnitřních struktur buněk. Do roztoku fixačního činidla můžeme rovněž přidat další látky, jako je peroxid vodíku, saponin aj., které ovlivní průběh fixace.

Jedněmi z často používaných fixačních činidel jsou zástupci skupiny aldehydů. Jedná se o glutaraldehyd, formaldehyd a akrolein. Glutaraldehyd je zárukou kvalitní fixace. Reaguje převážně s peptidy a bílkovinami a také s kyselinou deoxyribonukleovou, nereaguje s proteoglykany, některými polysacharidy a lipidy. Po fixaci GA si membrány zachovávají své prostupné vlastnosti. Formaldehyd vyniká svou vysokou penetrační rychlostí oproti glutaraldehydu. Kvalita výsledné fixace je však nižší. Protože formaldehyd zachovává antigenicitu preparátů, je vhodné jej použít ke speciálním účelům, jako je např. imunoznačení.

Další skupinou látek, které lze použít k fixaci, jsou oxidační činidla jako je oxid osmičelý, oxid ruteničelý nebo manganistan draselný. U těchto činidel je nutné dávat pozor na jejich silné oxidační účinky, vlivem kterých může docházet k poškození vnitřních komponent buňky.

Způsobů provedení fixace existuje celá řada, nejpoužívanějším způsobem je imerzní fixace, kdy se vzorek ponoří do fixačního roztoku. Poněkud drastičtější způsobem je fixace perfúzní, při níž je v celkové anestézii pokusnému zvířeti vstřikován fixační roztok přímo do krevního řečiště.

Při práci s fixačními činidly je nutné dbát zvýšené bezpečnosti, jelikož většina z nich má silné dráždivé a leptající účinky.

Dalším způsobem fixace, který lze použít, je fixace mrazová. Výhodou této fixace je uchování preparátu co nejbližší nativnímu stavu bez přídavku chemických činidel. Samotné zmrazení vzorku je však kritickým krokem, kvůli nebezpečí vzniku krystalků ledu, které by mohly vzorek nenávratně poškodit. Zmrazení se proto musí provést, co nejrychleji, abychom vzniku krystalků ledu ve vzorku zamezili. Tento nepříznivý vliv můžeme omezit ošetřením vzorku před zmrazením kryoprotektantem, kterým je například glycerol, ethylenglykol, sacharóza aj. V posledních letech zaznamenal tento způsob fixace velký rozvoj a i nadále je snaha jít v přípravě vzorků pro elektronovou mikroskopii tímto směrem. Dostupná je řada komerčně dodávaných přístrojů, ve kterých lze mrazovou fixaci provádět i s následným dalším zpracováním vzorků jako je krájení, sušení, apod.

Dalším krokem, který po fixaci a promytí následuje, je odvodnění preparátů. Kromě již výše zmíněných důvodů pro odstranění vody z preparátu je také jedním z důvodů to, že většina zalévacích médií není mísitelná s vodou. Během odvodňování je preparát postupně umísťován

do roztoků s rostoucím podílem dehydratačního činidla až je všechna voda v preparátu tímto činidlem nahrazena. Z činidel, která se pro tento účel nejčastěji používají to jsou ethanol a aceton. V praxi se nejčastěji používá vzestupná řada roztoků o koncentraci 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% a 100%.

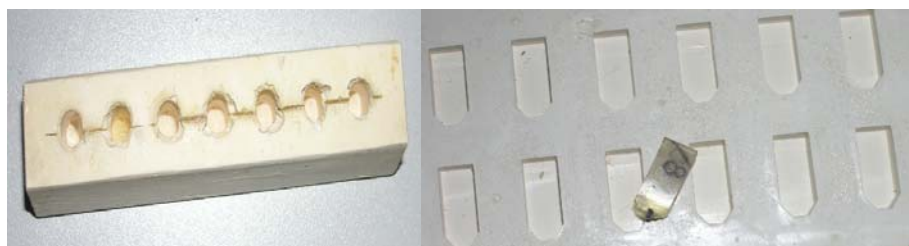
Nevýhodou použití ethanolu je, že reaguje se zbytky oxidu osmičelého za vzniku densních precipitátů. Protože není přímo mísitelný s epoxidovými a polyesterovými pryskyřicemi musí být mezi odvodněním a zaléváním zařazen v mezistupni propylenoxid.

Aceton je mísitelný se všemi používanými pryskyřicemi, ale oproti ethanolu se mu připisuje větší extrakce buněčného materiálu, hlavně lipidů. Odvodnění je kritickým krokem přípravy vzorků, jelikož bývá často zdrojem řady artefaktů. Může docházet k extrakci lipidů, proteinů a sacharidů, k značným objemovým změnám a vzniku řady precipitátů.

Třetím krokem přípravy je zalévání vzorků do zalévacích médií. Pryskyřice nám vzorek stabilizuje tak, že je možné ho poté krájet na ultratenké řezy. Tato zalévací média by měla splňovat řadu požadavků. V první řadě by měla být stabilní ve vakuu a při ozáření svazkem elektronů. Podstatné je také, aby vykazovala dostatečnou mechanickou pevnost v tenké vrstvě a vzniklé bločky by měly mít přiměřenou tvrdost pro lepší krájení. Další z důležitých vlastností, které by pryskyřice měly mít, jsou nízká viskozita, rovnoměrná polymerizace bez objemových změn a poškození ultrastruktury buňky a rozpustnost v běžných dehydratačních činidlech. Jednou ze zásadních vlastností je také to, že by pryskyřice neměla ve výsledném obraze na stínítku vykazovat svou vlastní strukturu.

Před samotným zalitím preparátu se musí provést infiltrace, kdy je vzorek postupně prosycován pryskyřicí. Vzorek necháme projít řadou roztoků pryskyřice s dehydratačním médiem s rostoucí koncentrací pryskyřice. Urychlit prosycení lze za pomoci mikrovln či změnou tlaku (exikátor).

Samotné zalití vzorků pryskyřicí můžeme provést různými způsoby. Provedení však hlavně záleží na typu vzorku. Nejčastěji se vzorky zalévají dvěma způsoby a to plošným zaléváním a zaléváním do kapslí. Při plošném zalévání je vzorek orientován tak, aby oblast, kterou chceme prohlížet ležela co nejbližší řezné rovině bločku. Pro tento typ zalévání se používají silikonové formičky, které vydrží vystavení změnám teplot i agresivním složkám pryskyřic (Obr. 28). Nevýhodou zalévání do formiček je, že velký povrch pryskyřice je vystaven vzduchu, což ztěžuje polymerizaci některých zalévacích médií.



Obr. 28 Formičky na zalévání vzorků, formička pro zalévání do kapslí, formička pro zalévání plošné

V případě suspenzí nebo jiného drobného izolovaného buněčného materiálu je vhodné tyto vzorky zalévat do kapslí (Obr. 29). Materiálem, ze kterého bývají kapsle vyráběny, je polyetylén nebo želatina. Předností zalévání do kapslí je, že zabraňují většímu kontaktu pryskyřice se vzduchem, což se uplatní hlavně u pryskyřic, kterým kontakt se vzduchem při polymerizaci vadí (např. Spurr).



Obr. 29 Obrázek kapsle

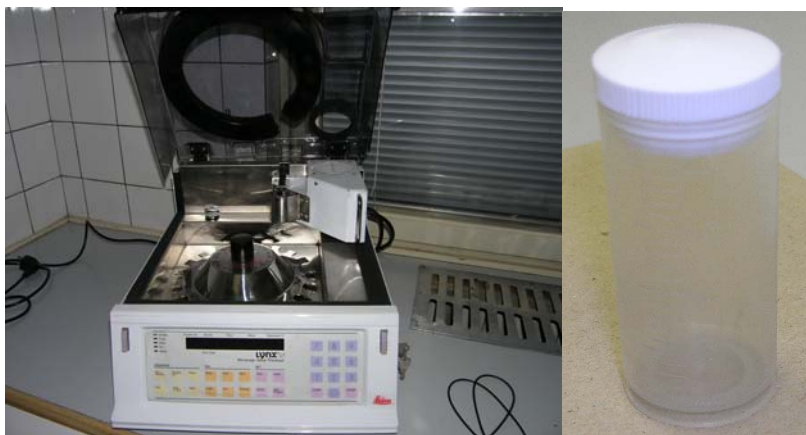
V současné době máme na výběr z řady různých druhů zalévacích médií. Pryskyřice se liší ve svých vlastnostech. To, jaký typ zalévacího média zvolit, záleží na účelu a typu vzorku.

Jedny z nejčastěji používaných jsou epoxidové pryskyřice patřící mezi vícesložkové. Vyznačují se rovnoměrnou polymerizací bez větších objemových změn. Oblíbenými zástupci této skupiny jsou Araldit, Epon a Spurr. Akrylátové pryskyřice je možné používat i při velmi nízkých teplotách. Nevýhodou je, že při polymerizaci jsou citlivé na obsah vzduchu. Zalévací média LR-White a LR-Gold snadno infiltrují do preparátu a mají nízkou viskozitu. Pro jejich polární a hydrofilní vlastnosti je vhodné je použít pro imunocytochemické účely, stejně tak jako Lowicryly, které jsou schopné polymerizovat za velmi nízkých teplot po iniciaci UV světlem. Dalšími zástupci jsou polyesterové pryskyřice a zalévací média mísitelná s vodou, Durcupan ACM nebo Nanoplast.

Iniciovat polymerizaci zalévacího média lze několika postupy. U epoxidových pryskyřic se využívá aktivace teplem při teplotách do 60°C. Dochází však ke snížení imunoreaktivity vzorku. Akrylátové pryskyřice polymerizují po ozáření UV světlem, v teplotním intervalu pokojové teploty a níže. Další možností je přidání chemického katalyzátoru nebo iniciátoru polymerizace. Většinou je však třeba ještě dodat energii v podobě UV světla nebo tepla.

Při práci se zalévacími médii je nutné mít na paměti, že řada z nich má karcinogenní účinky, a proto při manipulaci s nimi je nezbytné pracovat v rukavicích a dobře větrané digestoři.

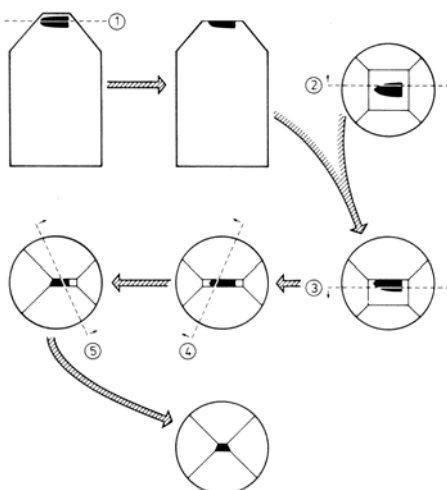
Pro rutinní přípravu vzorků, která je potřebná např. v patologických laboratořích, některé firmy zhotovily automatické přístroje, ve kterých je možné provádět odvodnění a zalévání do pryskyřic v nastavených programech. Tyto přístroje přípravu vzorků usnadní, hlavně co se časové náročnosti týká. Jednou ze společností, která tyto přístroje na trh dodává, je firma Leica (Obr. 30).



Obr. 30 Automat pro odvodnění a zpracování tkání v pryskyřici, laboratorní víalka, dává se do automatu v ni jsou umístěny všechny reagenty, kterými vzorek v automatu prochází.

Čtvrtým krokem přípravy je krájení ultratenkých řezů. Jak již bylo zmíněno tloušťka řezů pro transmisní elektronovou mikroskopii nesmí přesáhnout 100 nm. Se snižující se tloušťkou řezů se zlepšuje rozlišení struktur v obraze, ale kontrast se snižuje. Také manipulace s příliš tenkými řezy není při práci snadná. Ideální jsou řezy tloušťky 60-70 nm. Řezy se připravují z pryskyřicových bločků na ultramikrotomu a poté jsou sbírány na elektronmikroskopické síťky.

Před vlastním krájením je třeba upravit bloček tak, abychom si připravili řeznou plochu vhodného tvaru a velikosti a odstranili jsme přebytek pryskyřice. Této úpravě se v elektronové mikroskopii říká trimování (Obr. 31).



Obr. 31 Schematické znázornění trimovacího postupu, D.G. Robinson.1987

Řezná plocha se upravuje do tvaru „pyramidy“ s dostatečně širokou základnou, kdy vzorek je umístěn ve vrcholu „pyramidy“. Čelo bločku by mělo mít tvar pravidelného lichoběžníku. Řezy se tak při řezání skládají do pásky a lépe se s nimi manipuluje. Seřezání bločku se může provádět pomocí žiletky nebo trimovací frézky. Než se začnou připravovat ultratenké řezy je dobré zhotovit si nejprve řezy poloténkové, tloušťky 0,5-2 μ m. Tyto řezy se barví toluidinovou modří a kontrolují ve světelném mikroskopu. Takto si ze vzorku můžeme vybrat místo, které je zajímavé a ze kterého se ultratenké řezy budou krájet.

Nože, které se na ultratenké krájení používají mohou být skleněné (obr. 32) nebo diamantové.

Skleněné nože jsou levné, můžeme si jich připravit velké množství a po použití se vyhazují. Pro dobrou kvalitu řezné strany je dobré si nože připravovat těsně před použitím, neboť po delší době se zhoršují jejich povrchové vlastnosti pro ultratenké krájení. Skleněné nože se připravují rovnovážným lámáním na přístroji tzv. knifemakeru (obr. 33) ze skleněných tyčí. Úhel řezání by měl být 45°, proto je při výrobě těchto nožů dobré provádět tzv, pomalé lámání.



Obr. 32 Sklo na přípravu nožů, čtvereček v levé části se půlí a vzniknou nám 2 nože

Na řezné hraně je tento nůž schopen udělat přibližně 30 ultratenkých řezů, poté se musí hrana posunout nebo se musí nůž vyměnit. Před krájením se u řezné strany nože vytvoří vanička, která se naplní vodou, na jejíž hladinu se budou řezy splavovat. Připravené skleněné nože skladujeme na suchém a bezprašném místě.



Obr. 33 Knifemaker

Druhou alternativou pro krájení jsou nože diamantové (Obr. 34), které poskytují značně kvalitnější ultratenké řezy. Daní za to je vysoká cena těchto nožů v závislosti na délce řezné hrany a také to, že při poškození je nutné je znovu za poměrně vysokou cenu nechat přebrousit. Diamantový nůž nakrájí tolik řezů kolik potřebujeme. Komerčně dodávané nože jsou vyráběny tak, že jejich součástí je plastová vanička na naplnění vodou.

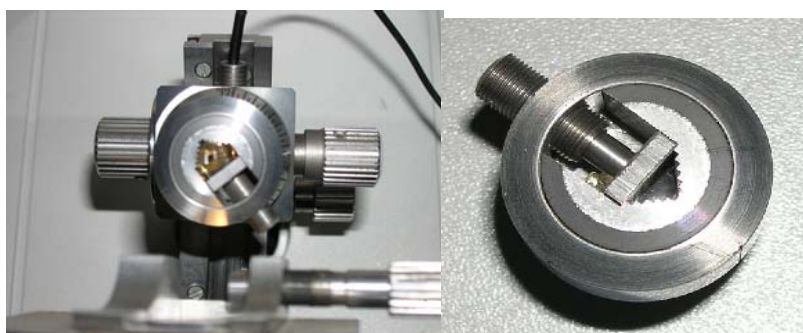


Obr. 34 Diamantový nůž

Vzorky krájíme v ultramikrotomech (obr. 35) a (obr. 36). Na výběr máme ze dvou typů. Prvním jsou ultramikrotomy s mechanickým posunem a druhé jsou ultramikrotomy, které k posuvu bločku k hraně nože využívají tepelné dilatace měděné tyče. Výhodou termodilatačního mikrotomu je schopnost krájet i velmi tvrdé materiály. Mechanický mikrotom je zase velmi stabilní v tloušťce ultratenkých řezů. Některé firmy vyrábí ultramikrotomy, které jsou kombinací těchto dvou typů.



Obr. 35 Ultramikrotom



Obr. 36 Uchycení kapsle v ultramikrotomu

Nakrájené řezy se kvůli lepší manipulaci umísťují na elektronmikroskopické síťky. Síťky (obr. 37) jsou zhotoveny z materiálů jako je zlato, platina, měď či nikl a mají v průměru standardně 3 mm. Liší se však tvarem a velikostí ok. Síťky s velkými oky umožňují pozorovat větší plochu řezu, avšak hrozí u nich nebezpečí, že se řez prohne a popraská. Prohýbání řezů se dá zabránit pokrytím síťky tenkou blankou, která řez podepře. Nejčastěji se používají formvarové a uhlíkové blány.



Obr. 37 Síťky

Posledním krokem po nakrájení řezů a jejich umístění na síťky je kontrastování. Problémem biologických vzorků v elektronové mikroskopii je jejich velmi nízký kontrast. Biologické vzorky jsou tvořeny atomy lehkých prvků jako je C, O, N, H, P, což má za následek nedostatečný rozptyl primárně urychlených elektronů na atomech preparátu. Z tohoto důvodu se u biologických preparátů musí přistupovat ke kontrastování atomy těžkých kovů, jako je U, Os, W, Pb, Mo. Kontrastování má však nevýhodu v tom, že pozorovaný objekt se vzdaluje své původní struktuře a je také velkým zdrojem artefaktů. Dalšími kroky, které nám mohou dopomoci ke zvýšení kontrastu, je snížení urychlovacího napětí, zmenšení objektivové clony či zvýšení tloušťky řezu, která však vede ke zhoršení chromatické vady a k neostrosti výsledného obrazu. Řezy můžeme kontrastovat ještě před zalitím tzv. v bloku nebo po nakrájení na ultratenké řezy přímo na síťkách. Prvním činidlem, které nám vlastně řezy už kontrastuje, je fixační činidlo oxid osmičelý. Při kontrastování v bloku se vzorek kontrastuje ihned po fixaci nebo při odvodňování. Používáme 0,5 až 1% roztoky kyseliny fosfowolframové nebo roztok octanu uranlylu. Vzorky kontrastované v bloku nemají oproti kontrastovaným řezům takový kontrast a ostrost. Při kontrastování ultratenkých řezů se nejčastěji používají kontrastující činidla octan uranlylu a citrát olova. Octan uranlylu lze připravit jako vodný nebo alkoholový roztok v koncentraci od 1 % do nasycení. Z buněčných struktur reaguje s nukleovými kyselinami a proteiny. Citrát olova se používá v 0,1-0,2 % koncentraci. Zvyšuje kontrast membrán, proteinů, glykogenu a nukleových kyselin. Protože citrát olova reaguje se vzdušným oxidem uhličitým, za vzniku nerozpustného uhličitanu olovnatého, musí se do nádoby, ve které se kontrastování provádí, přidat pár peciček NaOH nebo KOH zalitých vodou. Tyto hydroxidy snižují obsah CO₂. Po provedení všech těchto procedur se síťky s čerstvě zhotovenými a nakontrastovanými řezy umístí na suché, čisté a bezprašné místo.

4.5 Pracovní postup pro zapnutí, seřízení a vypnutí elektronového mikroskopu TESLA BS 500

Zavedení mikroskopu do provozu se provádíme podle následujícího postupu.

4.5.1 Zapnutí elektronového mikroskopu:

- 1 Zapnout hlavní vypínač na zdi (rozjedou se rot. vývěvy)
- 2 Pustit vodu (neprotéká - li voda, ozve se houkačka)
- 3 Uzavřít ventil rychlochlazení (vzadu na mikroskopu)
- 4 Po několika minutách pustit difúzní vývěvu (tlačítko DIF)
- 5 Zapnout předvakuum (tlačítko PREVAC.)
- 6 Po 15 minutách přepnout z PREVAC na AUT.
- 7 Dosažení dostatečného vakua indikuje měřák vpravo (výchylka > 80)
- 8 Po dosažení vakua možno zapnout mikroskop:
 - a. Tlačítko SUPPLY
 - b. HV
 - c. Katoda
 - d. Čočky (bývají trvale zapnuty)

4.5.2 Základní centrování mikroskopu

Předpoklady:

- vyčerpaný tubus na pracovní vakuum
- zapnout VN 90 kV tlačítkem 6
- zapnuté tlačítko 8 žhavení katody

- potenciometr 7 otočen zcela vlevo
- tlačítko 2 předpětí Wehneltova válce otočeno v levo na doraz

Jsou vysunuté všechny clony tzn. K2, OBJ. a PP. Všechny čočky jsou vypnuté a preparát máme vysunutý. Tlačítko 45 přepínač funkcí je v poloze ZV 1, knoflík 48 potenciometr plynulého zvětšení je vytočený doleva, tlačítko 47 zvětšení je v poloze 1. Díly tubusu, které jsou mechanicky centrovatelné uvedeme imbusklíčem do střední polohy, tím pádem nebudou viditelné přesahy jednotlivých dílů. (Šrouby 8, 9, 11, 12, 30, 30a, 31, 31a). Přibližně ve střední poloze má být horní pólový nástavec objektivu a pomocný projektiv PP. Zkontrolování téhle polohy je možné jen, když je mikroskop v rozebraném stavu. Potenciometrem 7 žhavení vlákna otočíme vpravo, až na měřicím přístroji 1 vzroste výchylka. Potenciometrem dále neotáčíme, když už výchylka dále neroste, protože jinak by mohlo dojít ke spálení katody. Vlákno je nažhaveno do nasyceného proudu, když výchylka nevzrůstá. Nyní by se měl na fluorescenčním stínítku objevit svítící bod. Jestliže se svítící bod neobjeví, otáčíme šrouby 8 a 9 tak dlouho dokud se na stínítku svítící bod neobjeví. Maximální jas svítícího bodu nastavujeme šrouby 8 a 9. Jakmile svítící bod svítí dlouho na jednom místě fluorescenčního stínítka, mohl by vypálit v daném místě díru. Zapneme tlačítko 46 HP. Světelná stopa se objeví na stínítku. Nastavení maximálního světla provedeme tlačítky 23, 24, 26 a 36. Zapneme tlačítko 38 OBJ. Zmizí světlo na stínítku. Maximálního osvětlení docílíme opět pomocí tlačítek 23, 24, 26 a 36. Osvětlená oblast má průměr 70 mm. 23, 24, 26 a 36. Vpravo nastavíme knoflík 22. Nejmenší svítící stopu nastavíme doprostřed stínítka za pomoci tlačítek 23, 24, 25, 26 a 36. Do K2 zasuneme clonu otočením tlačítka volby otvoru clony vpravo. Otočíme knoflíkem 24, kombinací otočení středního a bočního tlačítka clony 14 dosáhneme stavu, že při otáčení tlačítkem 24 se světlo centricky zvětšuje a zmenšuje, ale neuhýbá na stranu. Zapneme tlačítko 21 K1 + K2. Obvykle zmizí ze stínítka světlo. Koncentrovat a centrovat světlo na maximální jas doprostřed stínítka se snažíme pomocí tlačítek 23, 34 a současně korelaci tlačítky 26, 36. Minimální stopu nastavíme tlačítky 24 a 25 následně potenciometrem 7 otáčíme vlevo vlákno katody mírně podžhavíme, jakmile se na stínítku objeví jasné svítící jádro obklopené nesouměrným prstencem, také může při větším rozcentrování při podžhnutí světlo obvykle nějakým směrem zmizet. Dožhavíme vlákno a šrouby 8 a 9 posouváme stopu směrem, kterým nám zmizelo světlo. Světlo docentrujeme doprostřed stínítka tlačítky 26 a 36, jakmile se při dožhávání objeví dutý paprsek - jasné svítící jádro obklopené asymetrickým prstencem. Stopu posouváme ve směru širšího lemu šrouby 8 a 9 a zpátky tlačítky 26 a 36 tak dlouho dokud není lem svítícího jádra symetrický. Jakmile je při podžhnutí svítící jádro obklopeno symetrickým prstencem, přestáváme daný postup opakovat. Tlačítkem volby otvoru clony 14 opět vysuneme clonu a vytočíme vlevo, když knoflík směřuje směrem dolů, tlačítky 51 a 52 vykorigujeme tvar skvrny, aby nám tvořil rovnostranný trojúhelník. Opět zasuneme clonu. Na základě toho jsme vykorigovali astigmatismus K2. Kontrolu provádíme pomocí následujícího postupu. Dožhavíme vlákno katody a otáčíme knoflíkem 25. Musí se nám zmenšovat nebo zvětšovat obraz svítící stopy, ale nemůže moc měnit kruhový tvar. Do polohy DIF 1 přepneme přepínač funkcí 45 a potenciometrem 49 nastavujeme difrakční bod. Doprostřed stínítka nastavíme bod pomocí šroubů 34 a 33. Přepínač funkcí 45 zapneme do polohy ZV1, přepínač 22 přepneme vpravo. Nastavujeme minimální průměr stopy pomocí tlačítek 23, 24 a 25 a šrouby 11 a 12 posouváme stopu přes střed stínítka. Maximální průměr stopy přepneme přepínačem 22 vpravo, kterou následně centrujeme doprostřed stínítka za pomoci tlačítek 26 a 36. Obraz minimální světelné stopy v obou krajních polohách přepínače 22 je přibližně uprostřed stínítka, přestáváme opakovat daný postup. Vložíme preparát - blanka s otvory. Nastavíme potenciometrem 48 zvětšení takové, abychom měli obrazem pokryté celé stínítko. Musíme najít na preparátu vhodný malý otvor a posuvy 31 a 32 jej posuneme doprostřed stínítka. Zaostříme preparát tlačítky 41, 42 a 43. Otočíme vlevo knoflíkem 24 a 25. Knoflík 3 Δ VN zapneme. Okolo

určitého bodu se začne periodicky natáčet obraz preparátu. Bod se nenachází ve středu stínítka. Obraz posouváme šrouby 20 a 21, abychom měli umístěný střed otáčení ve středu stínítka. Centrovací šrouby 20 a 21 nemůžeme vyšroubovat víc než je potřeba pro vycentrování. Poškození je nebezpečné při opětovém zašroubování. Pouze při odejmutém K2 se může zašroubovat, když pinzetou navedeme tlakem tyčky do otvorů v objímce horního pólového nástavce. Musíme zkontrolovat jestli se difrakční bod nachází uprostřed stínítka (šrouby 33 a 34). Přepneme do polohy DIF. 2 přepínač funkcí 45 a opakujeme postup centrování na rotaci obrazu šrouby 22 a 21. Knoflíkem 3 vypneme a řadičem zaostření obraz přeostrujeme. Obraz preparátu se začíná periodicky otáčet kolem určitého bodu. Doprostřed stínítka dopravíme pomyslný bod pomocí šroubů 31, 31a, 30a, a 30 a následně ho na obrazovce kontrolujeme jestli se střed otáčení přiblížil středu stínítka. Přepneme do polohy DIF. 1 přepínač funkcí 45 a difrakční bod dostavíme doprostřed stínítka za pomoci šroubů 33 a 34. Postup centrování na Δ VN, Δ I a nastavení difrakčního bodu opakujeme tak dlouho, až se obraz v obou případech otáčí okolo středu stínítka a difrakční bod je uprostřed. Překontrolujeme celý postup centrování elektronového mikroskopu. Dobře vycentrovaný mikroskop má středy Δ VN, Δ I, difrakci uprostřed stínítka, při přepínání K1 a K2 se musí osvětlení rozbíhat centricky a minimální světelná stopa je uprostřed stínítka. Symetrický obraz dutého paprsku musí vzniknout při podžhnutí vlákna.

4.5.3 Běžné centrování mikroskopu

Běžné centrování se omezuje pouze na dostavení světla pomocí knoflíků 26 a 36 a po výměně katody vycentrování K1 - K2 a dutého paprsku, při korelaci astigmatismu K2, jak je popsáno v základním centrování.

4.5.4 Vypnutí elektronového mikroskopu:

- 1 Vypnout katodu
- 2 Vypnout HV
- 3 Vypnout difúzní vývěvu (tlačítko DIF)
- 4 Otevřít ventil rychlochlazení (vzadu na mikroskopu)
- 5 Po 20 minutách vypnout hlavní vypínač (na zdi)
- 6 Zastavit vodu

4.5.5 Odstavení přístroje

Jestliže dojde k odstavení přístroje na dobu asi 1 týden je potřeba nechat tubus pod vakuem, které nemusí být udržováno čerpací soustavou. Pokud chceme mikroskop uvést znovu do provozu, provedeme to podle postupu, který je popsán v zapnutí elektronového mikroskopu. Jestliže je přístroj odstaven na dobu delší než 1 týden, je třeba, aby se alespoň jedenkrát za týden předčerpával tubus rotační vývěvou. Vyjmeme vysoušedlo z komory předsoušeče. Jakmile dodržujeme těchto opatření, dáváme předpoklady k rychlému uvedení přístroje do provozu bez zvláštních opatření.

4.6 Provoz a obsluha elektronového mikroskopu

Obsluhu elektronového mikroskopu můžeme rozdělit do tří skupin :

- 1 uvedení mikroskopu do chodu
 - 2 seřízení optické soustavy
 - 3 manipulace s fotokazetou a snímkování
- [4], [5], [6], [7], [8], [10], [16], [19], [21], [27], [28], [31], [33], [36]

5. Vyhodnocení dosažených výsledků mikroskopických vyšetření

5.1 Vytvoření vzorků z plicní tkáně a kosterní svaloviny

Oba tyto vzorky byly pořízeny stejnou metodou, kterou jsem detailně popisovala v kapitole 4.4.

5.2 Práce s mikroskopem

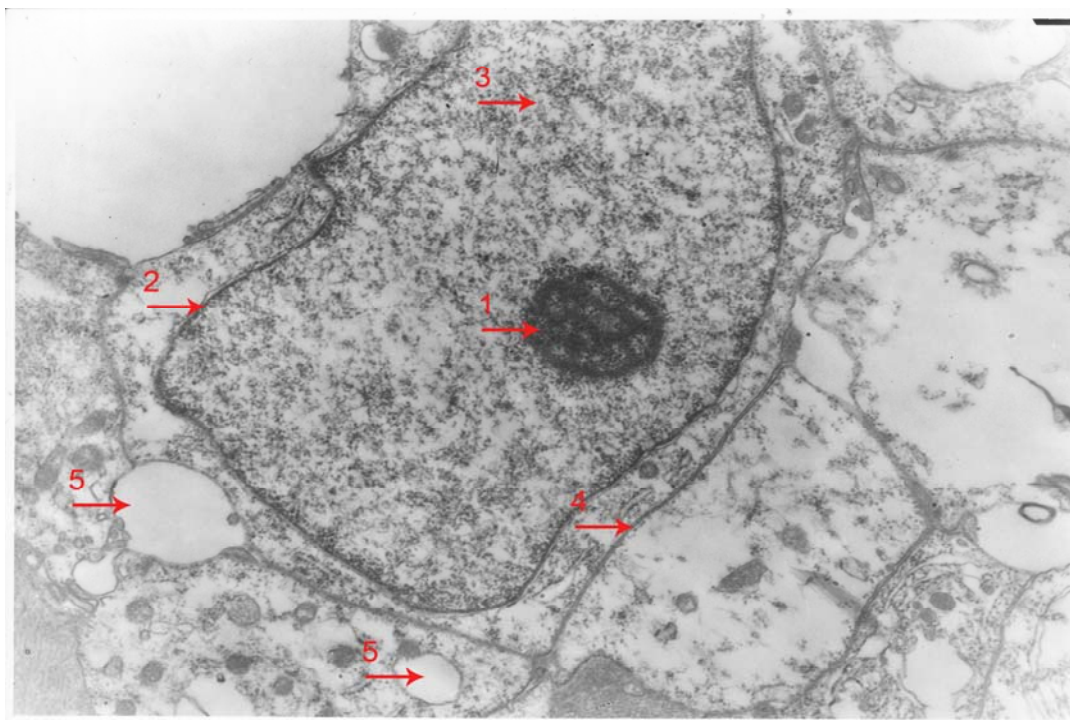
V průběhu mých návštěv ústavu patologie jsem prováděla ve spolupráci se slečnou Mgr. Bielnikovou také samotné mikroskopické pozorování vzorků tkání mikroskopem TESLA BS 500 (Obr. 38). Které jsme prováděly podle následujícího postupu. Nejprve jsme musely zapnout a seřadit mikroskop, jak jsem již popsala v kapitole 4.5. Poté jsme v mikroskopu pozorovaly preparáty plicní tkáně a kosterní svaloviny. Dále probíhat samostatné focení. Jakmile jsme vše vyfotili bylo možno přístroj vypnout dle pracovního postupu vypnutí, které jsme provedli podle postupu v kapitole 4.5.

5.3 Záznam obrazu

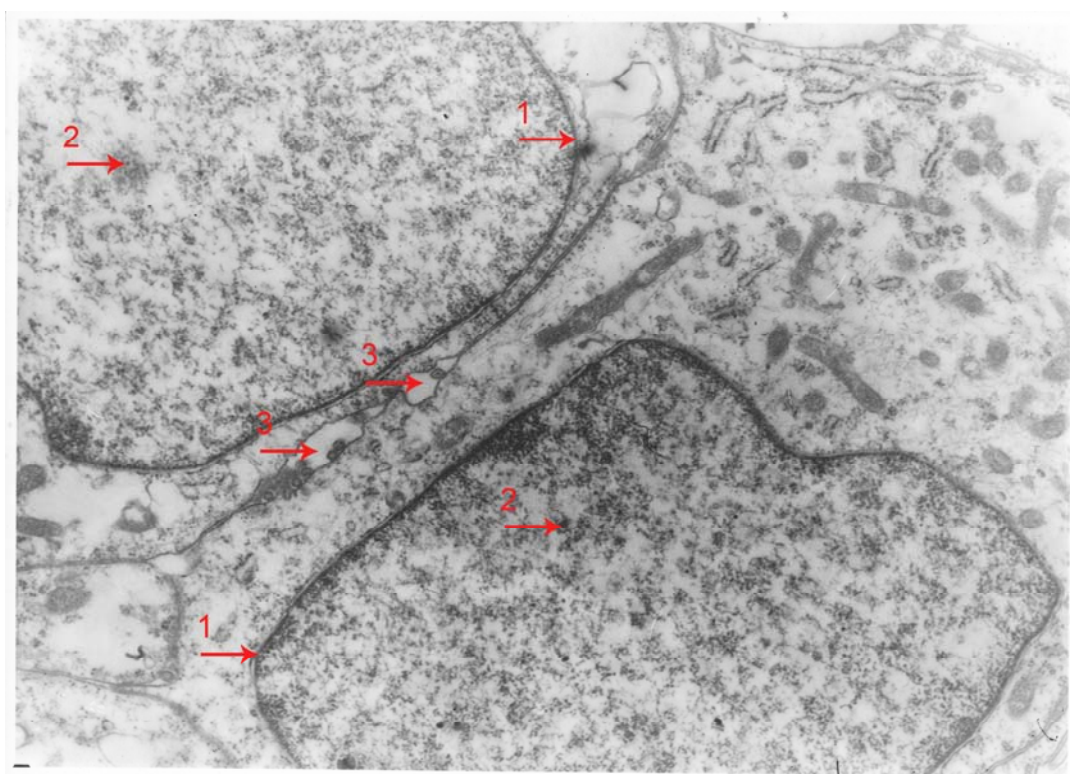
Záznam obrazu je detailně popsán v kapitole 3.5



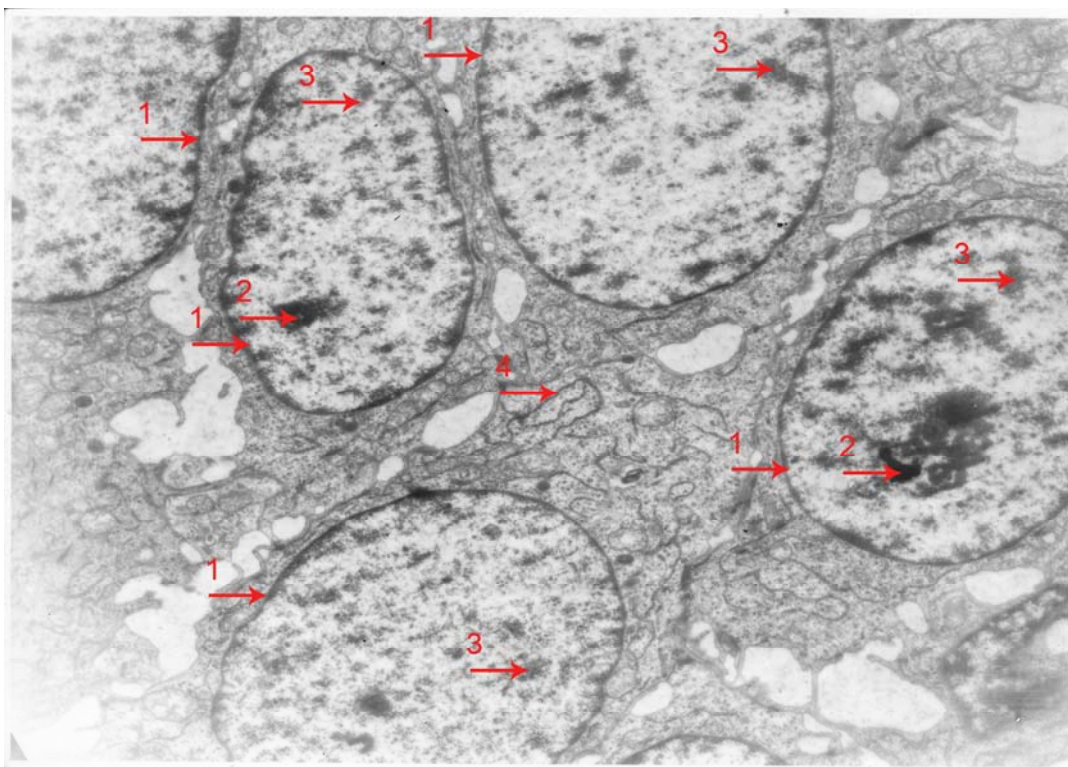
Obr. 38 Elektronový mikroskop TESLA BS 500



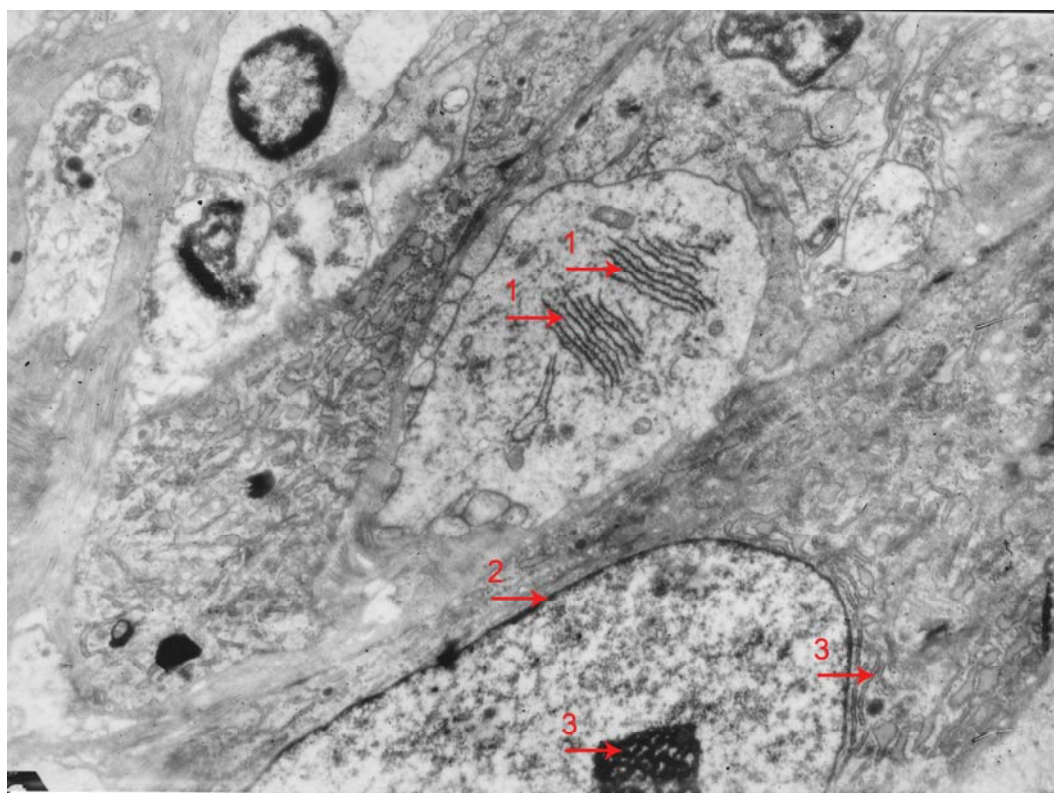
Obr. 39 Plicní tkáň (8800x), 1 - jadérko, 2 - jádro, 3 - rovnoměrně rozložený chromatin, 4 - jaderná membrána rozdělující buňky, 5 - intercelulární cisterny



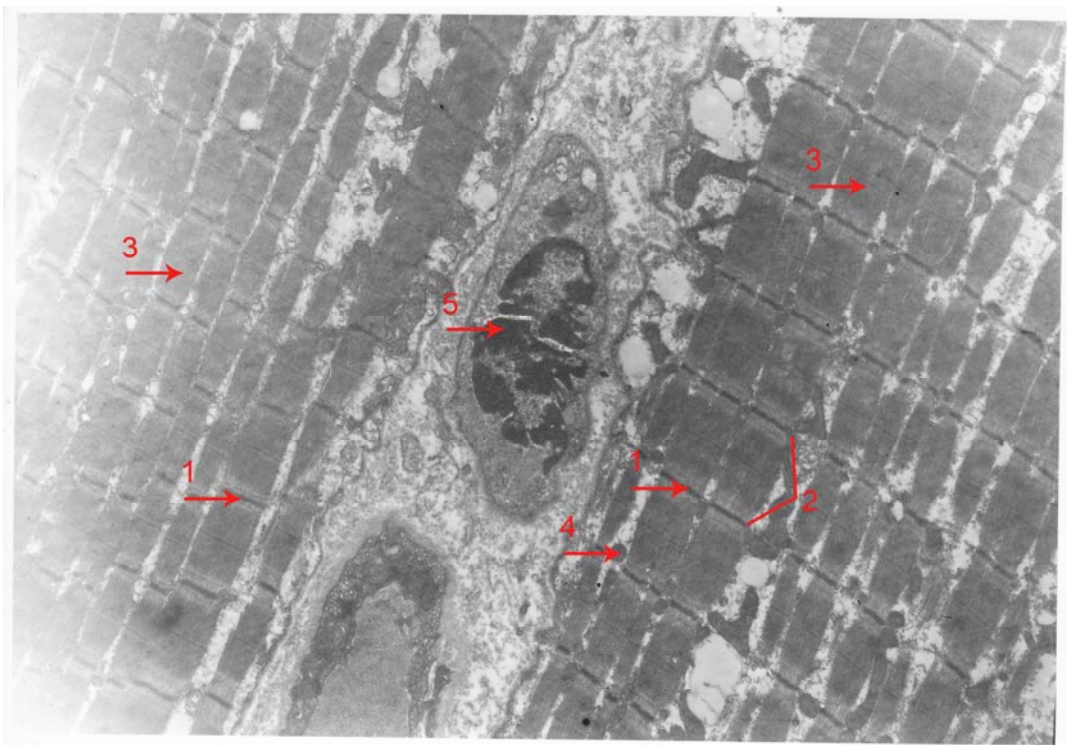
Obr. 40 Plicní tkáň (8800x), 1 - jádro, 2 - chromatin, 3 - intercelulární cisterny



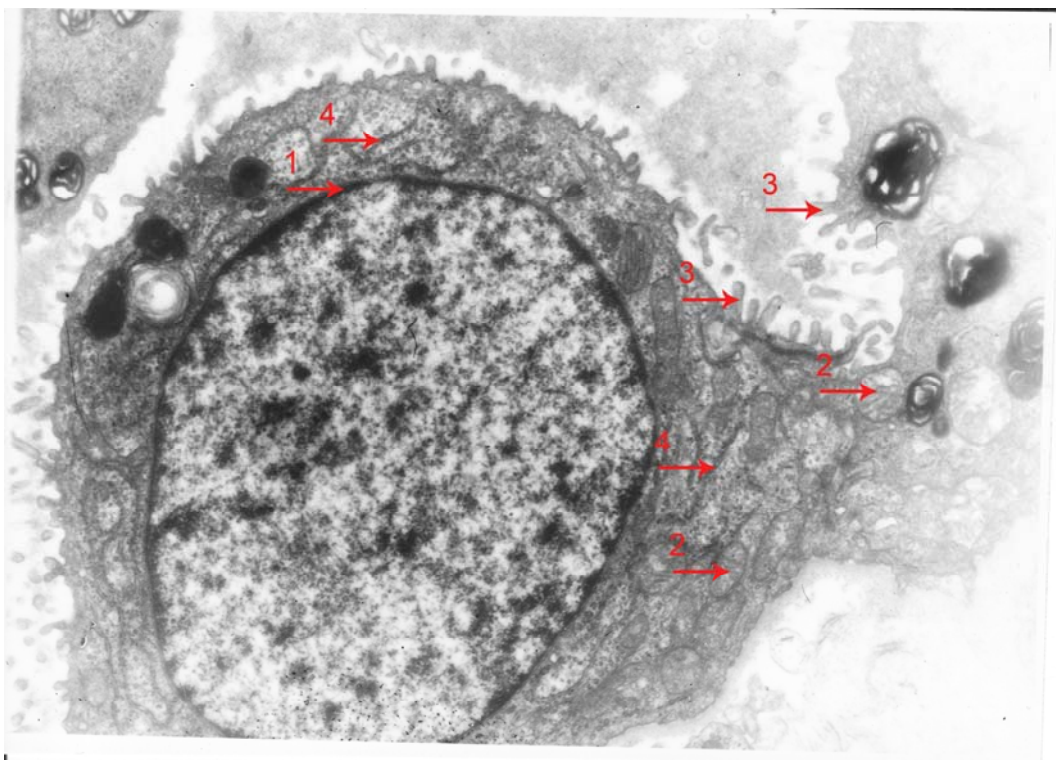
Obr. 41 Plícní tkáň (3480x), 1 - jádro, 2 - jadérko, 3 - chromocentrum, 4 - endoplasmatické retikulum



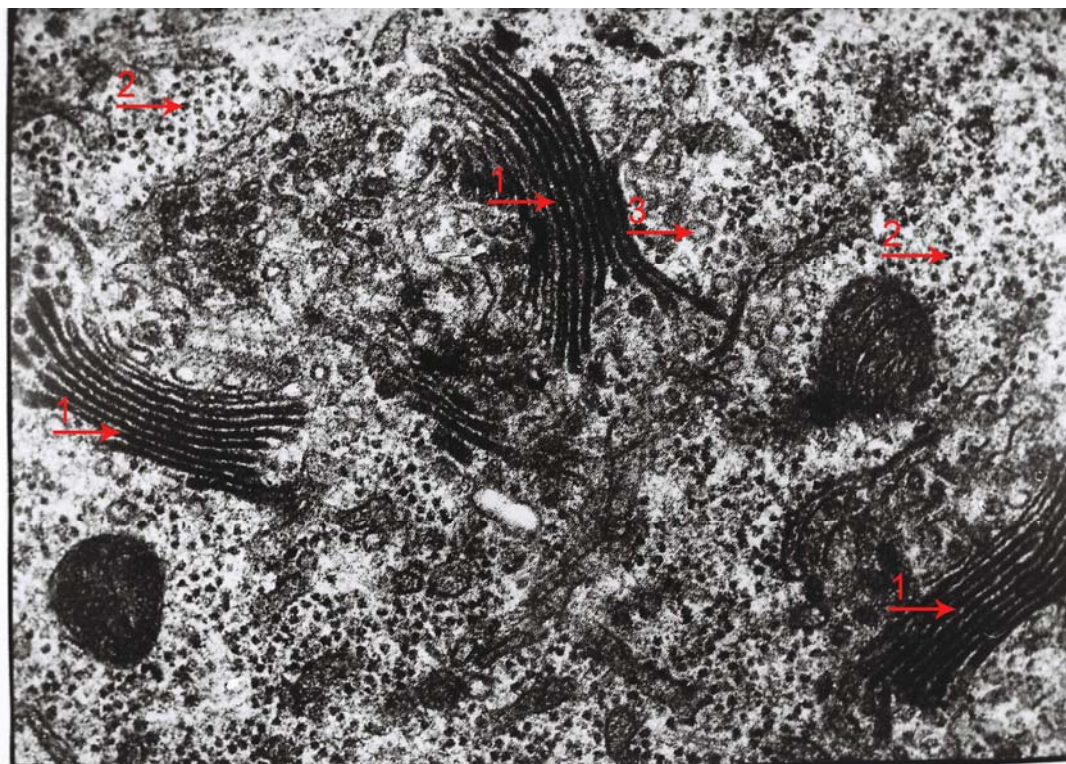
Obr. 42 Plícní tkáň (2360x), 1 - Golgiho komplex, 2 - jádro, 3 - jadérko



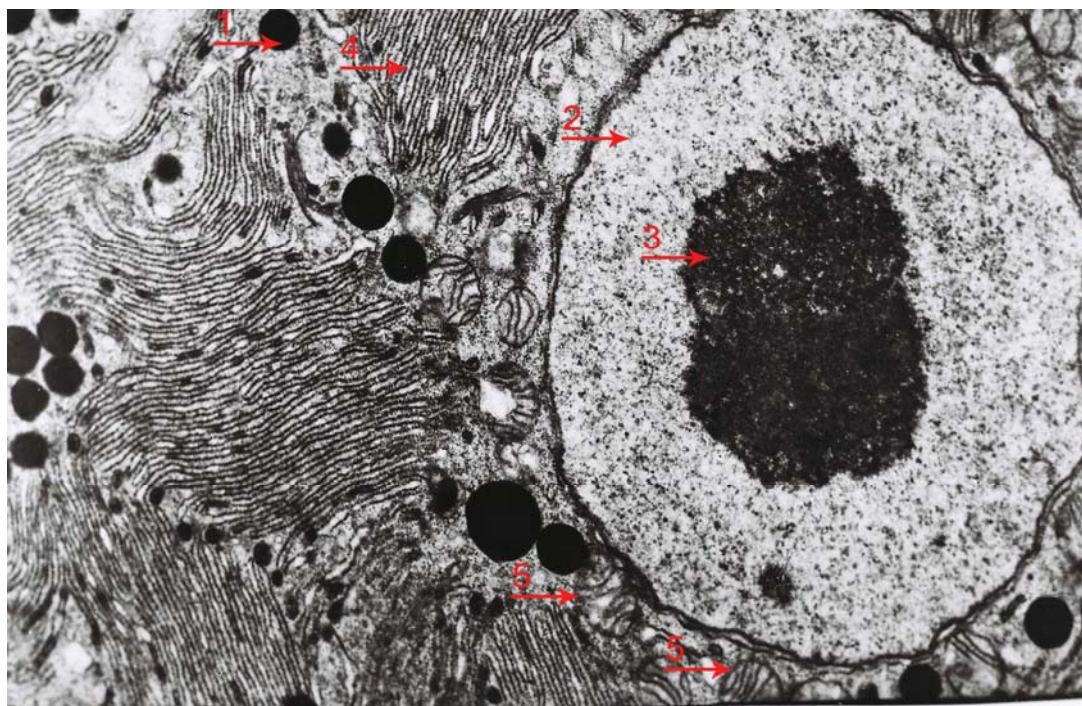
Obr. 43 Kosterní svalovina (3500x), 1- Z-disky, 2 -sarkomera, 3 - actin/myosinová vlákna, 4 - mitochondrie, 5 - jádro kosterní buňky



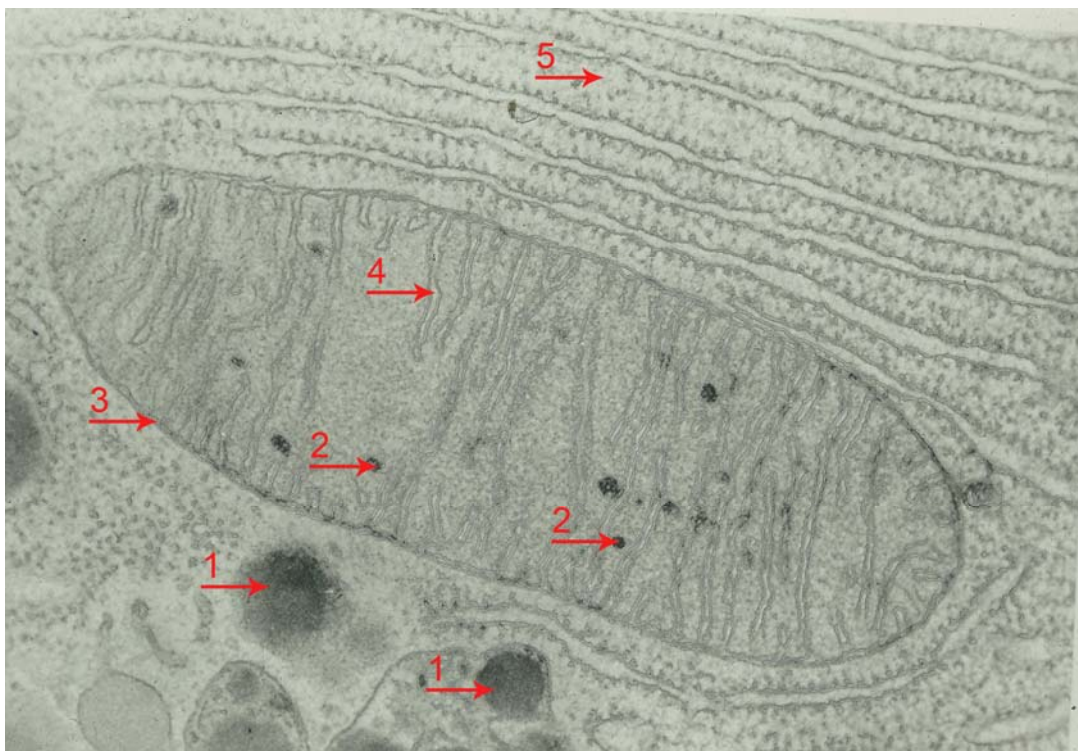
Obr. 44 Granulární pneumocyt (5030x), 1 -jádro, 2 - mitochondrie, 3 - mikrokľky, 4 - endoplasmatické retikulum



Obr. 45 Plicní tkáň (40 000x) 1 - Golgiho komplex, 2 - ribosom, 3 - lysozom



Obr. 46 Plicní tkáň (40 000x), 1 - zrno glykogenu, 2 - jádro, 3 - jadérko, 4 - endoplasmatické retikulum, 5 - mitochondrie



Obr. 47 Mitochondrie (54 000x), 1 - lyzozom, 2 - ribosom, 3 – vnější membrána mitochondrie, 4 - krysty, 5 – drsné endoplasmatické retikulum



Obr. 48 Mitochondrie (58 000x), 1 – vnější membrána mitochondrie, 2 - krysty

[15], [17], [18], [20]

6. Závěr

V průběhu mé práce sem se seznámila s přípravou vzorku pro elektronovou mikroskopu, elektronovým mikroskopem TESLA BS 500 a následným pozorováním a rozpoznáním organel.

Bohužel, ale mikroskop nebyl dlouhou dobu v provozu, tak bylo obtížné jej znovu zprovoznit. U mikroskopu občas nastávaly různé problémy. Jeden z problémů byl, že po výměně katody byl přístroj rozostřený. Daný problém opravovali technici, kteří se specializují na Teslu. Další z problémů, s kterým jsme se setkaly při mikroskopování bylo pálení preparátu. Tento jev nastával, jakmile jsme pozorovali delší dobu na jednom místě nebo, když jsme preparát příliš zvětšili.

Mikroskop se povedl opravit a dát do provozu, ale bylo možno pouze pozorování preparátu. Samotné focení nebylo možné.

Proto jsem byla donucena, abych splnila praktickou část mé práce, použít fotografie, které mám v 5-tém bodě vyhodnocení dosažených výsledků ze sbírky pana Doc. MUDr. Jaroslava Horáčka, CSc.

Když se dá mikroskop plně do provozu budou se vytvářet fotografie, které následně budou sloužit jako atlas.

Tato práce by měla sloužit pro výukové účely Vysoké Školy Báňské, především pro obor Biomedicínský technik, ale také by měla sloužit fakultě zdravotnických studií.

Seznam použité literatury

- [1] Delong A., Drahoš V. Praktická elektronová mikroskopie, Nakladatelství československé akademie věd Praha 1958
- [2] Hrazdira I., Mornstein V., Lékařská biofyzika a přístrojová technika, Neptun Brno 2006, ISBN 80-86850-01-3
- [3] Halliday D., Resnick R., Walker J., Fyzika vysokoškolská učebnice obecné fyziky, redakce českého překladu Dub P., Komerská J., Lencová B., Musilová J., Obdržálek J., Štrunc M., Vysoké učení v Brně – nakladatelství VUTIUM a PROMETHEUS Praha
- [4] Svět poznání – lidské tělo z vydavatelství Marshall Cavendish
- [5] Anatomie člověka, přeložila MUDr. Kateřina Orlová vydalo nakladatelství Fragment, Humpolecká 1503, Havlíčkův Brod první vyd. 2005 ISBN 80-253-0080-3
- [6] Abrahams, P., Druga, R.: Lidské tělo- Atlas anatomie člověka. Ottovo nakladatelství, s.r.o., Praha 2003, ISBN 80-7181-955-7
- [7] Holibková, A., Laichman, S.: Přehled anatomie člověka. Univerzita Palackého, Olomouc, 1999, ISBN 80-7067-665-5
- [8] Horáček, J., Kincl, M.: Cytologie. Ostravská univerzita, Ostrava, 1996, ISBN 80-7042-312-9
- [9] Kalina T., Pokorný V. 1981: Základy elektronové mikroskopie pro biology. Univerzita Karlova, Praha
- [10] Hulínský V., Jurek K. 1982: Zkoumání látek elektronovým paprskem. SNTL Praha
- [11] Ludvík J.: Elektronová mikroskopie. V: Prosser V. a kol. 1989: Experimentální metody biofyziky. Academia Praha
- [12] Mráz P., Polónyi J. 1988: Metody elektronovej mikroskopie živočišných tkanív. Veda, Bratislava
- [13] Rýc M., Čiampor F., Wagner M. 1989: Elektronová a imunoelektronová mikroskopie ve virologii. Avicenum, Zdravotnické nakladatelství, Praha
- [14] LICHTÉ H. – LEHMANN, M., In: Proc. EUREM 12, Brno, Czech Republic, July 9-14, 2000, Vol. 3, I47.
- [15] ZSF - fakulta zdravotnických studií - archív ústavu patologické anatomie - Doc. MUDr. Jaroslav Horáček, CSc.
- [16] Firemní návod obsluhy elektronového mikroskopu TESLA BS500
- [17] F. N. Ghadially, Ultrastructural pathology of the cell, Butterworths. London, 1975
- [18] G. R. Dickersin, Diagnostic electron microscopy, Springer, 2000
- [19] D.G. Robinson, Methods of preparation for electron microscopy, Springer, 1987
- [20] F. N. Ghadially, Diagnostic electron microscopy of tumours, Butterworths. London, 1980

- [21] <http://microscopy.fsu.edu/primer/java/electronmicroscopy/magnify1/index.html>
- [22] <http://www.hei.org/research/aemi/emt.htm>
- [23] http://cs.wikipedia.org/wiki/Transmis%C3%AD_elektronov%C3%BD_mikroskop
- [24] http://cs.wikipedia.org/wiki/Rastrovac%C3%AD_elektronov%C3%BD_mikroskop
- [25] <http://cs.wikipedia.org/wiki/Mikroskop>
- [26] http://cs.wikipedia.org/wiki/Elektronov%C3%BD_mikroskop
- [27] <http://cs.wikipedia.org/wiki/Organely>
- [28] <http://cs.wikipedia.org/wiki/Cytoplazma>
- [29] http://www.fch.vutbr.cz/~zmeskal/obring/presentace_2003/04_opticke_mikroskopy.pdf
- [30] <http://www.vesmir.cz/clanek/konfokalni-mikroskop>
- [31] http://cs.wikipedia.org/wiki/Bun%C4%9B%C4%8Dn%C3%A9_j%C3%A1dro
- [32] <http://referaty-seminarky.cz/mikroskop/>
- [33] <http://www.paru.cas.cz/lem/book/>, Ing. Jana Nebesářová, CSc., Elektronová mikroskopie pro biology
- [34] <http://atmilab.upol.cz/texty/TEM-teorie.pdf>
- [35] https://atlases.muni.cz/atlas/stud/atl_cz/main+metody+specmet.html
- [36] <http://www.sci.muni.cz/ptacek/CYTOLOGIE6.htm>
- [37] http://wikipedia.infostar.cz/el/electron_microscope.html
- [38] http://investice.ihned.cz/c6-10053280-23124880-i00000_d-svet-z-brna-pod-drobnohledem
- [39] http://www.isibrno.cz/index.php?lang=_cz&co=/ustav/history.php&nalogovan=&id_druh_menu=3&Nerolovat=1&v=1
- [40] http://cs.wikipedia.org/wiki/Konfok%C3%A1ln%C3%AD_mikroskop
- [41] <http://www.vesmir.cz/clanek/kontrast-v-opticke-mikroskopii>
- [42] http://www.optic.cz/popis_mikroskopu.html
- [43] <http://natur.cuni.cz/parasitology/parpages/mikroskopickatechnika/svetelnamikroskopie.htm>